日本産主要魚類の成長—VI.

サ ン マ

安田秀明・藤田四郎・赤池清人・苅部信二
木本清暉・春原 弘・浜田悦之・羽山泰夫

(1960 年 11 月 10 日受理)

GROWTH OF JAPANESE PRINCIPAL FISH—VI.
SAURY (*Cololabis saira*)

Hideaki YASUDA, K. AKAIKE, S. FUJITA, Y. HAMADA, Y. HAYAMA,
S. KARIBE, K. KIMOTO and H. SUNOHARA*

On saury there are different frequency curves between its abdominal scale rings and that of its upperside (Fig. 1-I・II).

We tried to get the calculation value of body-length at the time when the rings appeared on the scale of upperside. Based on this data and the season of ring formation, February and September, drew a growth curve (Fig. 2).

We knew then there are two populations different from spawning season.

サンマの鱗相には2つの型のあることが RUMYANIZEF (1947) と堀田 ('60) によつて知られている。魚体背部の円形鱗では同心的に配列した circuli が密になつて輪紋を形成するが，腹部の菱形の鱗では体軸にほぼ直角にならんだ circuli が曲つて輪紋を形成する。体側には鱗相も輪数もともにこの中間型の鱗があるがこれは検鱗しなかつた。

サンマの体長測定と採鱗は横浜市内のある魚屋で，9 月 16 日から 11 月 3 日までの間に 6 回行なつた。個体別に採鱗することはできなかつたので，魚を入れた箱に付着していたものを集め，鱗の大きさや形のそろつたものを選んで用いた。測定した体長組成 (24~31 cm) の分布からみて 10 月 20 日次前のものを A 群 (平均体長 29.5 cm) 他を B 群 (28.6 cm) とした。島根県の境港に 5 月下旬に水揚げされたものから得たサンマを C 群 (29~33 cm, 平均体長 30.5 cm) とし，円形鱗だけを用いた。

円形鱗の circuli 密度がどの程度まで変つたものを輪紋とみるかは規定することが困難であつた。Table 1

Table 1. Frequency of number of rings on the cycloid scale of saury.

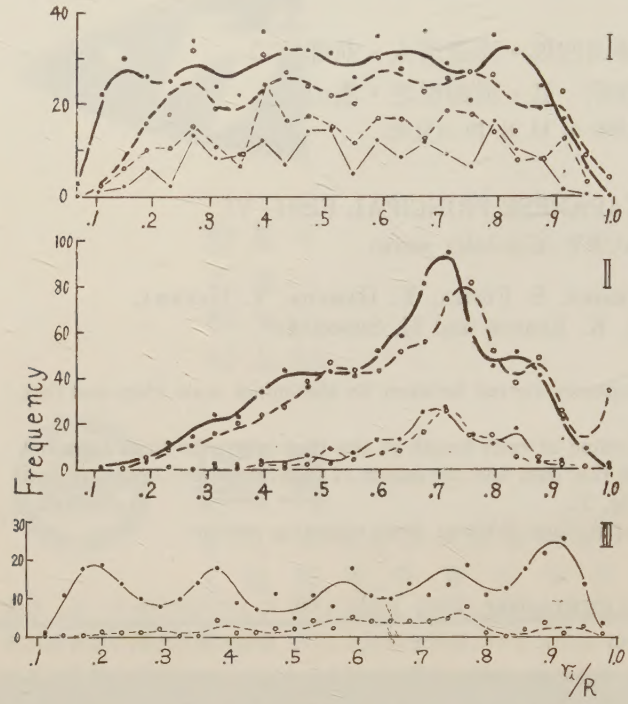
Date	Group B.L. cm	Reading method	Number of scale with 1~6+ rings					
			1	2	3	4	5	6+
Middle part of Oct. '57	A 29.5	a	0	2	6	22	21	2
		b	4	24	30	13	12	6
Latter part of Oct. '57	B 28.6	a	1	0	4	32	50	13
		b	0	15	15	8	6	6
May '59	C 30.5	a	0	0	7	40	35	4

A, B: Pacific coast (Tohoku), C: Japan Sea coast (Shimane).
a: Total of clear and indistinct rings, b: Clear rings.

* 東京水産大学 (Tokyo Univ. Fish., Shiba Kaigandori 6, Minato-ku, Tokyo)

から知られるように輪数はまちまちであつて，すべての輪紋を読取つたaでは4・5輪のところに山があり，特に不明瞭なものを除いたbでは 2・3 輪のところに山がある。

なおA群とB群では鱗の縁に新しい輪紋をもつものがかなり多数あつたが，これは測定しなかつた。



Ⅰ: **cycloid scale,** upper side on the saury (○ A group, ● B group), ——·——: total of clear and indistinct ring, ——— : clear ring.

Ⅱ: **diamond scale,** abdominal of body (○ A group, ● B group), ——·——: total (number of ring 1, 2 and 3) ——— : only one ring on the scale.

Ⅲ: **cycloid scale,** upper side on the saury (C group), ● total of clear and indistinct ring, ○ clear ring.

Fig. 1. Curves showing the relative distance frequency of scale ring, r_i/R, R and r_i express respectively the distances from scale focus of edge and the ring.

鱗の成長の核心から各輪紋までの距離 r_i と，鱗長 R とを測定し，各輪紋の鱗長の対する比 r_i/R をとつた比輪紋長の頻度分布曲線を Fig. 1 に示した。輪紋を読取る方法 a・b によつて比輪紋長の頻度分布には大差がないので区別せず集計した。まづ Fig. 1-Ⅰ と Ⅲ について，およそ谷のところで区切り，それぞれの山に属する頻度数の和とその試料の鱗の数とが対応するような範囲を定めて輪数を決定し，つぎに各輪紋が形成されたときの平均の比輪紋長 $\overline{r_i/R}$ を求めた。鱗の発生する時の体長を 2.5cm としてそれぞれの計算体長 l_i を算出してこれを Table 2 に示した。なお Fig. 1-Ⅰ に見られる B 群の最初の山は A 群にはあらわれていないので，稚魚輪のようなものと見てこれを除外した。

Table 2. The relation between the relative distance frequency of scale ring, $\overline{r_i/R}$, (R and r_i express respectively the distances from scale focus of edge and the ring) and calculated body-lengths, l_i cm.

Group	Formation of ring	Feb.	Sept.	Feb.	Sept.	Feb.
A*	$\overline{r_i/R}$		.27	.44	.62	.75
	l_i		9.8	14.4	19.2	23.5
B*	$\overline{r_i/R}$		.28	.44	.64	.84
	l_i		9.8	14.0	19.2	24.5
C	$\overline{r_i/R}$	.19	.37	.56	.74	.91
	l_i	7.8	12.9	18.2	23.2	28.0

* New ring began to appear on edge of many scales.

円形鱗の輪紋は年2回2月と9月とに形成されることが知られている[1)]。試料 A・B では鱗縁の輪紋は除いてあるので，外側から数えて奇数番目のものは2月に，隅数番目のものは9月に形成されたものと考えられる。し

たがつて試料A・Bは第一輪紋が9月に形成されているので春から夏にかけて生れた群で，Cは第一輪紋が2月に形成されているので秋から冬にかけて生れた群と見られ，成長曲線はFig. 2のようになる。5月の試料は10月に孵化したものと見ると満1年で14cm，満2年で24.5cmとなり，10月の試料は4月に孵化したものと見ると満1年で16cm，満2年で25cmとなる。Fig. 2の成長曲線は成長の季節的過程から知られているところと一致する[2]。

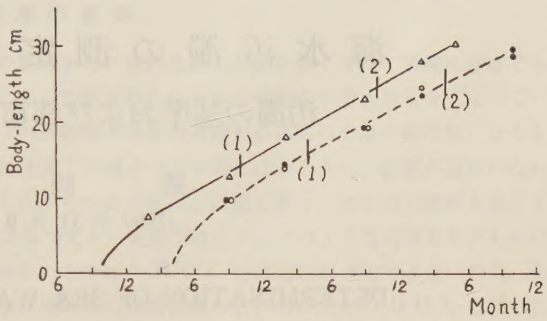


Fig. 2. Growth curve of the Saury, for the calculated and observed body-length.
Group: ●A, ○B, △C (full year).

つぎに菱形鱗では輪数が1～3のものが主であつて，4輪以上のものは極くまれであつた。輪数1, 2, 3をもつ鱗の数の割合はそれぞれA群では31, 53, 16%．B群では34, 52, 15%であつた。Fig. 1-IとIIから菱形鱗全体とただ1つの輪紋をもつものとについての比輪紋長の頻度曲線には位置がほぼ一致する3つの山がある。この3つの山の位置は円形鱗のものとも大体は一致する。しかし輪紋のあらわれる率は円形鱗の場合とは全く違つていて，計算体長20cm頃のものだけが特に目立つている。サンマの生物学的最小形が20cmぐらいであること[3]を考えると興味ある事実であり，先に述べたアユの鱗[4]の場合と同様に形成の要因を吟味するときに重要な決め手の1つとなるものと思われる。

サンマの試料を下さつた中央魚類株式会社営業部の青木利夫氏に感謝する。

文　献

1), 2) 安田秀明：鱗の輪紋の研究—IV．種族の系統判別への利用，未印刷．
3) HATANAKA, M.: Biological studies on the population of the saury, *Cololabis saira*, Tohoku, Jour. Agr. Res., **6** (3), 1956.
4) 安田秀明：当年アユの鱗に顕われた2つの輪紋についての考察．本誌，**9** (5), 1941.

海水汚濁の測定について—Ⅲ.

汚濁の基準および都市廃水による汚濁

諸岡等

(1960 年 11 月 9 日受理)

DETERMINATION OF SEA-WATER POLLUTION—III. A STANDARD OF POLLUTION CAUSED BY CITY WASTE

Hitoshi Morooka*

In the previous paper the author has reported on a newly established indicator of sea-water pollution, B. O. I. and has showed a few examples of the pollution survey using the indicator. The B. O. I. was able to indicate the sea-water pollution caused by organic source, which was hardly indicated by B. O. D. or C. O. D. method.

In this paper he presented the data concerning B. O. I. value in unpolluted fishing areas adjacent to the coast of Nagasaki Prefecture to elucidate the B. O. I. value in an unpolluted area and to make the B. O. I. value a determination standard of pollution. In the results of the research, it is confirmed that an area, in which the B. O. I. value is below 1.5 is an unpolluted one. Since the B. O. I. value means the oxygen consumption of microorganism at 30°C in 24 hours and the number of microorganism is equivalent to the number of marine bacteria, the number of microorganism can be calculated by using the value of oxygen consumption of marine bacteria per unit cell, 20.2×10^{-12} mg O_2/cell/hr, which was estimated by ZoBell.

The B. O. I. value of 1.5 corresponds to the number of bacteria, 4×10^5/cc.

A survey was conducted into distribution of pollution in sea-water by using surface sea-water in Nagasaki Harbor. The largest value was obtained at the innermost of the harbor and the value decreased with the stations toward the mouth of the harbor. Vertically, the B. O. I. value was the largest in the surface and oxygen content and salinity became larger with depths. This phenomenon is considered to be due to the entrainment of the surface sea-water, which may bring water masses high in oxygen content from the mouth of the harbor. The number of microorganism in the water of Nagasaki Harbor was $1\sim2\times10^6$/cc. This is equivalent to the number of marine bacteria calculated by using B. O. I. value. The number of bacteria in the mud of the sea-bottom of the harbor was 10^9/cc.

筆者は有機廃水による海水汚濁を示す指標としてその海水中に存在する微生物の活性を用いることを試みた。すなわち試水に葡萄糖を 0.1% 添加し，30°C の暗所で 24 時間培養し，その間の酸素含量の減少 (B. O. I.) でこれを表わすことを提唱し[1]，また二，三の水質調査にこれを用いた例[2] を示して来た。

この方法は特徴として微生物の活性を測つていながら，微生物の種類や数等には触れないで，ただ化学的な考慮だけを払つている。汚濁判定にこれを用いるためには B. O. I. で測つた汚濁の基準をつくつておいて測定値との比較をすればよいのである。しかし B.O.I. で測つた汚濁基準は理論的に推定できるものでなく測定例を重ねてつくらねばならない。本報はこのような見地から漁業が正常に行なわれている海域として長崎県沿岸の沖合を，汚濁海域としては長崎港内を選び，B. O. I. の測定をしてその基準をつくつたものである。

* 長崎県水産試験場 Nagasaki Prefectural Fisheries Experiment Station, Nagasaki.

汚濁の基準

一般に沿岸水は岸に近いもの程，有機廃水等の陸地からの流れ込みの影響を強く受けて栄養は豊富であるために微生物はよく繁殖する。沖合水にはこれに反して陸地からの栄養の補給少く微生物も少くなつているが，海底からの湧き上り，あるいはプランクトンの残骸等の栄養の補給源があるので微生物は無くなるものではない。したがつて B. O. I. も岸からの距離に比例して減少するが零にはならない。漁業が通常行なわれている海域はこのようなところにあたる。しかしながら水域が変れば環境も変り，微生物の種類も活性もその影響を受けるので，沖合水の B. O. I. は少くはなつても一定値ではない。このような海域をわれわれは正常海域であると考え汚濁判定の基準とするのである。その時の B. O. I. は理論的に推定できないので，経験的に決めなければならない。如上の観点から筆者は長崎県沿岸諸漁場の水についてその B. O. I. を調べた。

試料は Fig. 1 に示す各点より採集した。これ等の諸点では未だ水質汚濁が原因となる漁業上の障害は認められていない。ただし No. 11 は長崎港内の汚濁箇所であり，比較のためにあげた。B.O.I. の外に B.O.D. および C. O. D. の測定結果を まとめて Table 1 に示す。

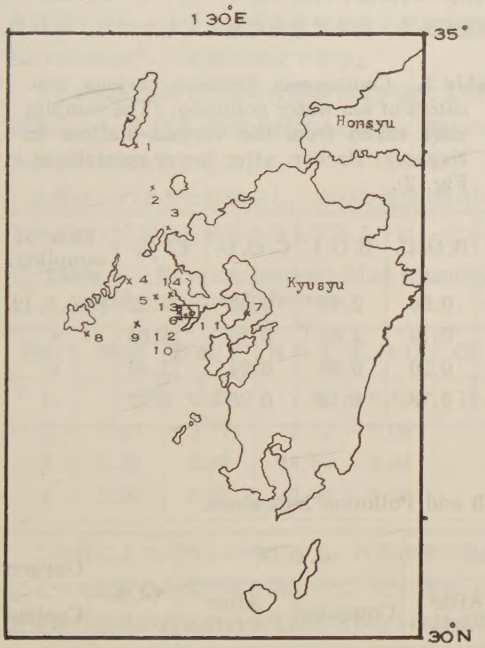


Fig. 1. Sampling Station around Nagasaki Pref.

Table 1. Comparison between various indicators of sea water pollution. (The samples were collected from the various marine stations around the coast of Nagasaki Prefecture.)

No.	B. O. D.	B. O. I.	C. O. D.	Cl ‰	Date of sampling.
1	0.38	1.57	0.64	16.68	1959. 9. 12.
2	0.21	1.69	0.64	17.11	〃
3	0.34	1.47	0.64	17.52	〃
4	0.36	1.51	0.90	18.65	1959. 9. 21.
5	0.19	0.95	0.56	18.60	〃
6	0.23	1.23	0.56	18.47	〃
7	0.20	0.56		18.04	1960. 2. 4.
8	0.35	0.42		18.89	1960. 7. 21.
9	0.31	0.42		18.51	〃
10	0.34	0.40		18.89	〃
11	0.02	7.12	0.26	18.18	1960. 8. 29.
12	0.05	0.62	0.25	18.52	〃
13	0.02	0.03	0.56	18.56	〃
14	0.04	0.12	0.64	18.58	〃

結果を総合すると正常海域の B. O. D. は 0.3 以下，B. O. I. は 1.5 以下，C. O. D. は 0.6 以下となり，各汚濁指標の間に特記するような関係は認められなかつた。ただし B. O. D. や C. O. D. の値がこのように小さくなると，測定誤差，採水法等の影響は強くなり，検討の対象とするのは容易でない。

ZoBell[3] によれば，海洋バクテリヤ 1 細胞が 22°C で 1 時間に消費する酸素は 20.9×10^{-12}mg であり，もし 0.05% の葡萄糖が添加されるとその消費量は 4 倍になる。それ故 $Q_{10} \fallingdotseq 2$ とすれば，B. O. I. を測定する条件すなわち 30°C で 24 時間培養する時の酸素消費量は $20.9 \times 10^{-12}\,\text{mg} \times 4 \times 2 \times 24 \fallingdotseq 4 \times 10^{-9}\,\text{mg}$ となる。

B. O. I. = 1.5 の時は培養海水 1cc 中から 24 時間では 1.5×10^{-3}mg の酸素が失われることになり，その海水中には $1.5 \times 10^{-3}/4 \times 10^{-9} \fallingdotseq 4 \times 10^{5}$/cc のバクテリヤが存在することになる。

同様な要領をもつて葡萄糖を添加しない B. O. D. の値 0.3 を採つて計算するとバクテリヤ数は 3×10^5 となる。

これ等の値は Zo Bell, Morita[4]がマニラ湾で調査して得た値 10^4-10^6 に相当するものであるが，しかしこれ等は従来報告されている値に較べて高すぎる。ただしこれはコロニーを数える培養法によつた値である。この方法は測定値の変動が大きく，さらに実在する菌の数パーセントを現わすにすぎず，直接に個体を数える方法によるとその 13～9700 倍の値を示すことがあると報告[5]されている。これに較べると本法には測定値の変動が少い利点があるが，菌数計算をするのに Zo Bell が推定した，海洋バクテリヤの酸素消費量を用いているので，得られ値は真の個体数でなく，それに比例した推定値である。

都市廃水による汚濁

長崎港は Fig. 2 に示すごとく，東から西に深く湾入した港湾であり，これに B. O. D. の高い2つの川と都市廃水のほとんど全部が流れ込んでいる。したがつて湾内の汚濁度はきわめて高い。汚濁の程度を知るために調査をした結果をまとめると Table 2 が得られる。採水の時は連日降雨の後で，当日も 72.1mm の降雨量があり，ために塩分は著しく低かつた。B.O.D.

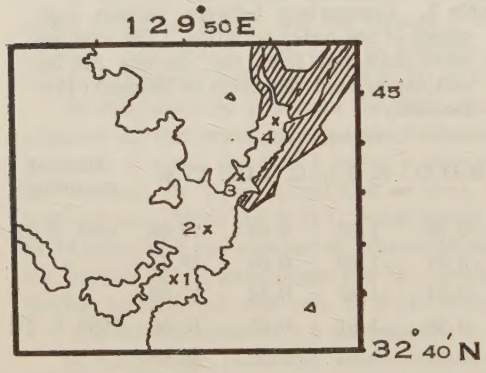


Fig. 2. Sampling Station in Nagasaki Harbor. (c. f. enclosed Area in Fig. 1)

Table 2. Comparison between various indicators of sea water pollution. (The samples were taken from the various stations in Nagasaki Harbor, after heavy rainfall. cf. Fig. 2).

No.	B. O. D.	B. O. I.	C. O. D.	Cl ‰	Date of sampling.
1	0.56	2.46	0.08	17.32	1960. 9. 12.
2	0.19	4.68	0.16	16.08	〃
3	0.20	6.88	0.24	13.46	〃
4	0.78	8.14	0.96	6.97	〃

Table 3. Relation between Depth and Pollution Indicators.

Sampling		B. O. D.		B. O. I.		C. O. D.		Cl ‰	Oxygen
Date and hour Trans. m.	Depth	Untreated	After Filtration	Untreated	After Filtration	Untreated	After Filtration		Content
9. 28. 9.00	0	2.35	1.41	8.08	5.38	2.00	1.82	16.30	3.84
	2	1.12	0.74	3.53	2.22	0.80	0.72	17.80	3.92
2.00m.	4	0.72	0.40	2.19	1.79	0.48	0.64	17.97	4.13
	6	0.68	0.50	1.99	1.66	0.56	0.48	18.19	4.15
10. 1. 9.00	0	2.44	1.02	10.60	11.10	3.46	2.96	14.61	
	2	2.18	0.80	5.66	4.50	2.50	1.10	18.06	
2.50m.	4	0.32	0.06	5.12	4.02	1.02	0.96	18.15	
	6	0.69	0.14	4.64	3.38	0.78	0.56	18.18	
10. 7. 23.00	0	0.64	0.49	12.00	8.53	1.36	1.28	15.40	
	2	0.41	0.56	5.90	5.80	0.85	0.72	18.24	
	4	0.48	0.36	4.19	4.38	0.77	0.69	18.45	
	6	0.46	0.45	4.76	4.82	0.72	0.75	18.45	

および C.O.D. は正常海域の値と大差なく各測定点間の差も小さい。これらの値は別々に測定した酸素含量の差あるいは逆滴定法によつて得られるものであるから，このように小さな値となる時は識別が困難である。これに反して B.O.I. の値は正常海域の値と異る上に，各点間の差も明瞭であり，その値はあらかじめ常識的に予想され得たように，湾奥部が最も汚濁しそれより離れるにしたがつて清浄化向する傾を示していた。B.O.I. の値から海洋バクテリヤ当量の菌数を推定すると 10^6 となる。

つぎに垂直的な分布を明らかにするために，第4点で 0, 2, 4, 6m の各層から採水して（深さ 6.70m）深さとの関係を求めて Table 3 を得た。試水は2分し，一方は東洋沪紙 No. 1 で沪別，他方は採水したままのものを分析した。したがつて前者に含まれる微生物は総べて水中に分散しているものであり，後者は凝集あるいは他物に附着している微生物をはじめ比較的大きなプランクトン等を含む。すなわち沪過によつて汚濁指標が小さくなればその中に浮游物が多いことを示す。またプランクトンの趨光性を考え，その影響をも併せて見るために昼間と夜間の区別を設けて採水ならびに分析を行なつた。その結果昼夜の別は少く，表層には有機物や微生物が多く下層には少いこと，これに反して酸素含量や塩分濃度は下層程多く上層には少いことが判明した。

以上の事実により，陸地より流れ込む河水や廃水は微細な有機物や微生物を含んだまま表層を一部の海水を伴つて流れ，下層にはその代替のため酸素含量の高い沖合水が港口部より湾奥部に流れること，すなわち Entrainment[6] の現象が推定できる。

さらに昼間採水したものは各層とも沪過によつて B.O.I. は少さくなるが，夜間採集したものについては表層にのみ B.O.I. の減少が認められる。海水の透明度も少ないのであるから，これは浮游物中に日光を嫌う生物の存在を思わせる。

水塊はこのような移動をし，その表層水中の浮游物の一部は除々に沈降して海底に蓄積されるのである。したがつて水質は分析値からも判るように一定でない。これに反して海底は移動しないし，その底質の変化も遅い。つぎに底質を調査した結果を示す。

Table 4. Relation between Mud Quantity and Pollution Indicators.

No.	Mud	B.O.D.	B.O.I.	C.O.D.	Cl ‰
1	0 g	0.15	1.92	0.40	18.30
2	0.83	0.77	3.72	2.08	
3	2.30	2.87	18.54	3.84	
4	5.90	6.57	40.62	6.57	

調査を行なつたのは第4点であり，採集は干潮時水深 6.70m の時である。底質の腐植含量は 5.65% であつた。

底質中の微生物の活性をみるために，その任意の量を 6m 層の海水 500cc に分散し，東洋沪紙 No. 1 で沪過して試水を作り，各汚濁度の測定を行なつた。その結果を Table 4 に示す。

この表によつて明らかなごとく，汚濁指標の値はいずれも底質の量に比例している。このことはこの方法によつて底質中の微生物を海水中に一定の割合（むしろ全部）で分散させ得ること，またこの操作をしても微生物の活性が急に変るようなことがないことがないことを示すものである。

つぎに底質 5.9g を使用した時の B.O.I. = 40.62 p.p.m., 6m 層の水の B.O.I. = 1.92 p.p.m. を使用して，底質 1g 中のバクテリヤ数を計算してみよう。

ここでは底質 5.9g を 6m 層の海水に分散させたのであるから，底質のみによる B.O.I. は海水の B.O.I. を除いたもの 40.62−1.92 = 38.7 となるはずで，底質 5.9g に相当する 500cc の水の酸素要求量は (38.7mg/1000) ×500 = 19.85mg となり，したがつて底質 1g が 24 時間に要求する酸素量は 19.85 mg ÷5.9 = 3.36mg となる。

前記のごとく 30°C の海水に葡萄糖を添加した時の海洋バクテリヤの酸素消費量を 4×10^{-9} mg/day とすれば，1g の底質中には 3.36mg ÷ 4×10^{-9} mg = 8.4×10^8 のバクテリヤが存在することになる。（ただしこの計算においては底質を海水に分散させた際，バクテリヤは海水中にも底質にも同じ割合に含まれるとする条件を設定した。）これ等のバクテリヤは底質の酸化還元に重要な役割を演じていることであろう。

要　　約

1. 汚濁度判定の基準を設けるため，長崎県沿岸で漁業が普通に営まれている地点の海水を調査し，正常海水は B.O.D. = 0.3, B.O.I. = 1.5, C.O.D. = 0.6 以下であることを知つた。これらの値はいずれも別々に測定した酸素含量の差あるいは逆滴定法によつて決められたものであるから差が大きくないと信頼度が少ない。したがつて B.O.I. によつた値が最も信頼される。また B.O.I. = 1.5 の値を示す海水中には海洋バクテリヤに換算して 4×10^5/cc のバクテリヤが存在することになる。

2. 長崎港湾内の汚濁度の水平分布は湾奥部が最高であり，湾口部に向つて緩和されている。垂直方向に対しては表層が最も汚れ，下層程弱くなる。この状態を最も明瞭に示すものが B.O.I. である。更にまた下層水の塩分，酸素含量等は上層水より多いことによつて Entrainment の現象が推定できる。また B.O.I. より港内のバクテリヤ数を計算すると，海洋バクテリヤ当量で数えて，海水中には $1\sim2\times10^6$/cc，底質中には約 10^9/g のバクテリヤが存在する。

文　　献

1) 諸岡　等：日水会誌，**26**，663 (1960).
2) 諸岡　等：日水会誌，**26**，1147 (1960).
3) Zo Bell, C. E.: Marine Microbiology, (1947) pp. 107.
4) Zo Bell, C. E. and R. Y. Morita: Gulathea Report, **1**, 152 (1957～1959).
5) Jannasch, H. W. and G. E. Jones: Limnology and Oceanography, **4**, 128 (1959).
6) 宇田道隆：海洋漁場学，pp. 38, 1960，恒星社　厚生閣版.

ON THE SPERMATOZOA AGGLUTINATING AGENTS OF THE DOG SALMON AND THE RAINBOW TROUT EGGS

Shigeru HAMANO*

(Received Nov. 11, 1960)

So called "egg water", that is, sea water with which sea urchin eggs have remained in contact for while, cause an agglutination of the homologous spermatozoa. It has been said that the agglutinating substance contained in egg water originates in the "jelly coat" surrounding the eggs. The chemical nature of the jelly coat has been studied by many investigators; it is considered to be a glycoprotein (cited from TYLER[1], '48). The agglutinating action of egg water on spermatozoa has been observed in the Fundulus (GLASER[2], '21). Similar spermatozoa agglutination was found also in rainbow trout eggs, the agglutinative substance having the nature of a globulin and a phosphatid (HARTMANN[3], et al., '47). The present author has reported that cluster formation of the dog salmon spermatozoa is induced by addition of the surface gelatinous substance of the egg. And also, that the sperm suspension of the rainbow trout was agglutinated strongly in lipovitellin-M/7.5 NaCl prepared from whole yolk of the eggs of the same species. But such an agglutination could not be detected in levetin-M/7.5 NaCl (HAMANO[4], '57). Extension of this line of study would seem to promise a vield of significant information for the understanding of the interaction of sperm and egg surface at fertilization.

The present paper is a further report on the spermatozoa agglutination by lipovitellin. Furthermore, the author found another spermatozoa agglutinative substance from the eggs. Several additional experiments have been made regarding the chemical nature and the neturalization of agglutinative action of the supernate by some chemical reagents and by dialysis.

Materials and Methods

The eggs and spermatozoa of the rainbow trout (*Salmo irideus*) and of the dog salmon (*Oncorhynchus keta*) were used an materials. The main parts of the experiments were carried out on materials of the rainbow trout unless otherwise stated. The dog salmon were taken at the YAGUMO and the SHIRIUCHI hatcheries in Hokkaido. The rainbow trout were collected at "Nanae Fish-Culture Pond" and the Mori rainbow Trout-Firm in Hokkaido. The author is much indebted to the staffs of the hatcheries and of the fish-firm.

The lipovitellin and levetin were prepared by the same methods as described in a previous paper (HAMANO[4], '57). In order to remove the lipid part from lipovitellin, a lipovitellin solution was frozen with alcohol-dry ice mixture and dried in high vacuum.

* Fac. of Fish. Hokkaido Univ. Hakodate, Hokkaido, Japan (浜野繁 北海道大学水産学部).

The frozen-dried lipovitellin was treated four times with alcohol-ether mixture followed twice by treatment with ether. The remaining vitellin fraction was dissolved in M/7.5 NaCl and the agglutinative action of the vitellin-NaCl solution upon the spermatozoa was observed microscopically.

The another spermatozoa agglutinating substance was prepared by the following method. The eggs were washed repeatedly in isotonic M/7.5 HaCl to remove ovarian fluid, and immersed in alkaline distilled water (pH 8.5) at 70°C for one hour. Resultant light-yellow coloured supernate was obtained by filtration. The supernatant fluid was used as sample solution after cooling and adjustment at pH 7.0. In this case, the supernate which contained broken eggs in the process of exudation of the eggs, were not used as sample solution.

Nextly, the eggs, washed in M/7.5 NaCl, were broken by pressure and extracted with distilled water (pH 7.0) at room temperature (13–15°C) for one hour. The supernate was adjusted to pH 7.0 by addition of 0.01 N HCl. The ultraviolet absorption spectrum of the sample solution was measured by BECKMAN's spectrophotometer.

The author is indebted for this analysis to Mr. I. TSUGINO. The spermatozoa agglutinating reaction was observed under a phase contrast microscope

Results and Discussion

Exudation of the spermatozoa agglutinative substance resulting from treatment with alkaline distilled water

As shown in Table 1, there was no occurrence of agglutination of the spermatozoa by the supernatant fluid which exudated out by immersion of the eggs into acidified distilled water (pH 3.5), but agglutination was caused by the supernatant fluid prepared by treatment of the eggs with alkaline distilled water (pH 8.5) at 70°C for one hour. Whether it was an acid or an alkali solution, the exudated solution, prepared by the use of M/7.5 NaCl and by 10% NaCl, did not show any effective action upon sper-

Table 1. Exudation of the spermatozoa agglutinative substance dependent upon the use of various media and changes in pH of the media before and after immersion of the eggs

Solution immersed	pH of medium before immersion	pH of medium after immersion	Agglutination of spermatozoa*
Distilled water	8.5	6.2~6.4	+++
M/7.5 NaCl		6.8	–
10% NaCl		6.4~6.6	–
Distilled water	3.5	5.4	–
M/7.5 NaCl		5.2	–
10% NaCl		5.8	–

* +: Positive agglutination of spermatozoa, –: Negative agglutination of spermatozoa. Exudation with use of acidified medium (pH 3.5) was performed at room temperature for one hour.

matozoa. The gelatinous coat of the egg was obtained by immersion of the eggs into N/100 HCl; this substance caused strong spermatozoa agglutination after adjustment of the pH value. But in the present results, it seems reasonably certain that the surface gelatinous coat of the egg which agglutinates the spermatozoa, is not dissolved out by such an acid solution. As evident from Table 1, the pH of an alkaline medium was decreased strongly by immersion of the eggs. It seems probable that a fair amount of acid substance was exuded from the eggs. Above stated spermatozoa agglutinative substance could be prepared not only from unfertilized eggs but also from fertilized eggs. But the agglutinative activity of the substance prepared from the fertilized eggs showed a lower value than that of the unfertilized eggs.

The author has confirmed the presence of mucoid in the inner swelling layer of egg membrane of the dog salmon (HAMANO[5], '49). The qualitative protein test of the supernatant fluid is shown in Table 2.

Table 2. Precipitation reaction of the spermatozoa agglutinative substance

Reagent	Precipitation*	Remark
Alcohol	+	Precipitation caused to occur by addition of three or four times volume of alcohol.
Water	−	
Ammonium sulphate	−	
Calcium chloride	−	
HCl	+	Precipitation caused to occur by addition of small volume of acid solution but it became transparent by addition of further excess volume of acid solution.
Lead acetate	+	
Crupein (crude)	+	pH regulated
Arginin (crude)	−	
Acrinol	+	

* +: Positive precipitation, −: Negative precipitation.

As shown in Table 2, the supernatant fluid showed a glycoprotein nature from the facts that it is not precipitated by ammonium sulphate but precipitated by alcohol and further, it showed a positive α-naphtol reaction. It is also precipitated by acrinol which probably isolated a carbohydrate part from glycoprotein. The acrinol which adhered to a precipitated material, was removed by 10% NaCl and activated clay with some difficulty. But thus purified precipitated material had no visible agglutinative influence on the spermatozoa.

Extraction of the spermatozoa agglutinative substance by distilled water and inhibition of its agglutinative activity

As stated in the previous section of this paper, another agglutinative substance was obtained by extraction of the ground eggs with distilled water. The supernatant

fluid (pH 7.0) caused a spermatozoa agglutination. On the other hand, the eggs were broken by pressure and washed with M/7.5 NaCl to remove yolk. The remaining egg membrane was treated with alkaline distilled water (pH 8.5) for one hour at 70°C and filtered to remove egg membrane. An agglutination of the spermatozoa did not occur in this supernate. From the above facts, it seems probable that the spermatozoa agglutinative substance might be originated from the inner part of the egg.

Above stated spermatozoa agglutinative substance was caused to lose its activity by treatment with active carbon and by dialysis. But ion-exchange resin (Amberlite IR 4B) had no inhibitory action on it. Similarly, the spermatozoa agglutinative substance which was prepared from exudation of the intact eggs with alkaline distilled water lost its activity upon application of active carbon and by dialysis. But it was caused to lose agglutinative activity by same ion-exchange resin. The inhibitory action of Amberlite IR 4B upon the agglutinative substance showed a lower activity than that of another active carbon and of dialysis of sample. These observations were summarized in Table 3.

Table 3. Exudation and extraction of the spermatozoa agglutinative substances and inhibition of their agglutinative activity

Method		Spermatozoa* agglutination	Remark
Exudation of egg membrane in distilled water (pH 8.5) at 70°C for one hr.		−	Prepared from the unfertilized eggs
Exudation of activated eggs in distilled water (pH 8.5) at 70°C for one hr.		+	
	Dialysis	−	
	Treatment with active carbon	−	
Exudation of unfertilized eggs in distilled water (pH 8.5) at 70°C for one hr.	Dialysis	−	
	Treatment with active carbon	−	
	Treatment with IR 4B	±	
Extraction of ground eggs in distilled water (pH 7.0) at room temperature for one hr.		+	
	Dialysis	−	
	Treatment with active carbon	−	
	Treatment with IR 4B	+	

* +: Positive agglutination of spermatozoa,
−: Negative agglutination of spermatozoa,

Absorption spectrum of the agglutinative substance and of the unagglutinative substance

Above described agglutinative substance was submitted to a spectrophotometric analysis. As shown in Fig. 1 and Fig. 4, both agglutinative substance showed re-

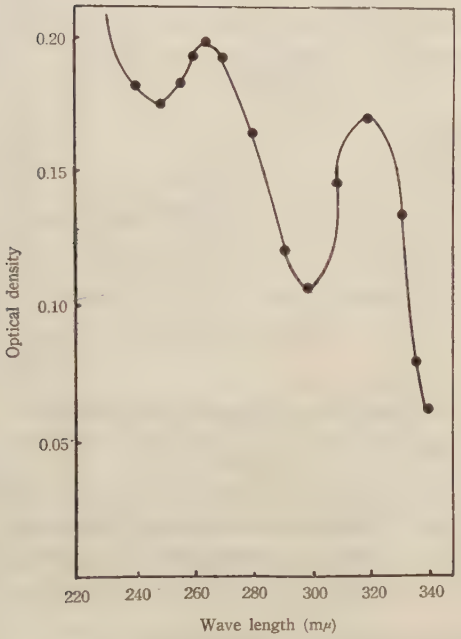


Fig. 1. Absorption spectrum of spermatozoa agglutinative substance prepared by causing exudation of intact eggs by the use of alkaline distilled water.

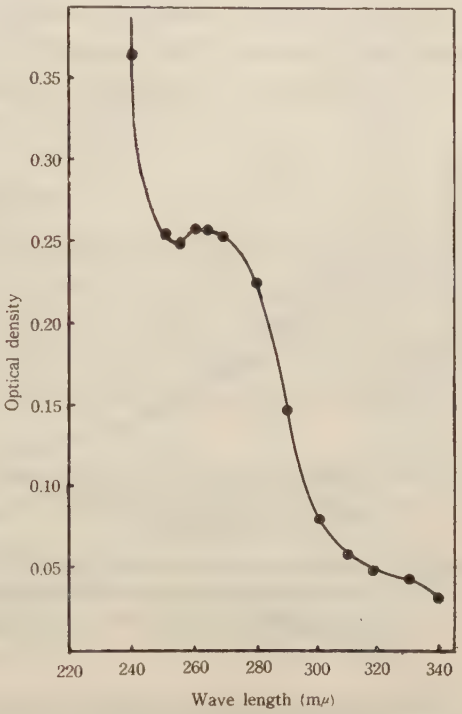


Fig. 2. Absorption spectrum of non agglutinative substance prepared by causing dialysis of agglutinative substance.

spectively their two peaks of ultraviolet absorption spectrum at 265 mμ and 320 mμ. The non-agglutinative substance, prepared by dialysis of the agglutinative substance, showed only a faint presence of absorption spectrum at 265 mμ. Both two peaks of absorption spectrum observed in the agglutinative substance were caused to disappear by treatment of the substance with an active carbon (Figs. 2 and 3).

Although no significant results were obtained in regard to a relationship between agglutinative substance and glycoprotein nature of the substance, the agglutinative substance seems probably to originate from some unknown substance which shows an absorption spectrum at 265 mμ and 320 mμ.

Since the agglutinative substance showed an absorption spectrum at 265 mμ, it would be expected that some nucleic acid-like substant is contained in the substance. But the agglutinative action of the nucleic acid–M/7.5 NaCl (open marketing goods, probably

prepared from yeast) upon the spermatozoa was not observed at various concentrations ranging from 0.1 to 1%. On the other hand, visible absorption spectrophotometric analysis was performed on an agglutinative substance. But in the present experiment, no remarkable peaks of absorption spectrum was detected.

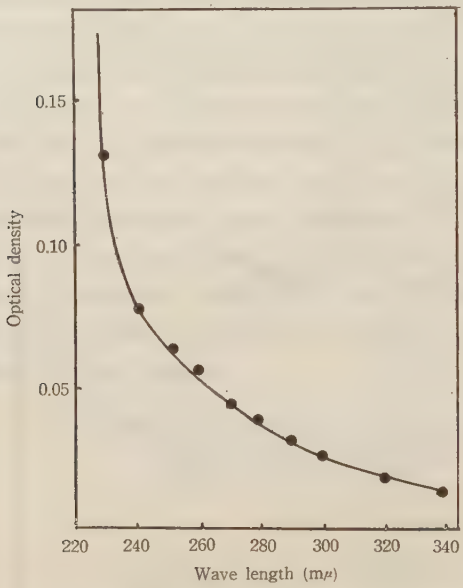


Fig. 3. Absorption spectrum of non-agglutinative substance prepared by treatment of agglutinative substance with an active carbon.

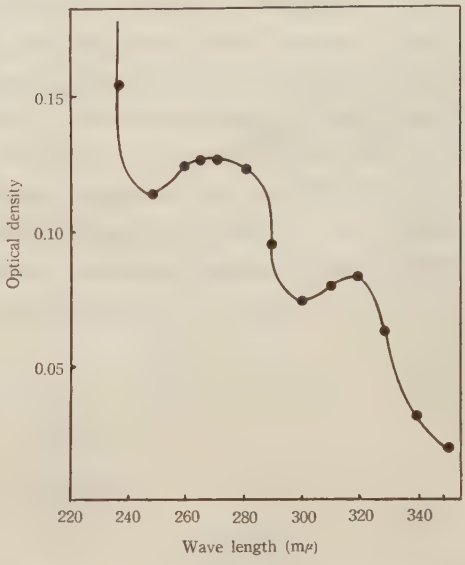


Fig. 4. Absorption spectrum of spermatozoa agglutinative substance prepared by causing extraction of the ground eggs by the use of distilled water.

Antagonism between lipovitellin and levetin in agglutination of the spermatozoa

In this section, in order to elucidate the agglutinative factor of lipovitellin, the lipid part of lipovitellin was removed by the method described in previous part of this paper. But no agglutinative action of the spermatozoa was found in vitellin-M/7.5 NaCl. In this case, slight dissolution of vitellin in M/7.5 NaCl occurred. From the above facts, the agglutinative action of lipovitellin upon the spermatozoa may probably be derived from the lipid part of lipovitellin.

Nextly, any agglutinative action of lipovitellin may be neutralized by some anti-agglutinative substance contained in the intact egg as in case of antifertillizin of the sea urchin egg. And so, in order to determined whether levetin-M/7.5 NaCl is capable of neutralizing the agglutinative action of lipovitellin or not, the levetin-M/7.5 NaCl and lipovitellin-M/7.5 were mixed and the agglutinative action of this mixed solution upon the spermatozoa was observed microscopically. Both solutions were prepared of the same protein concentration. The mixed solution which contained two times volume of levetin-M/7.5 NaCl was mixed with one volume of lipovitellin-M/7.5 NaCl.

The mixture did not cause any agglutination of the spermatozoa. But the antagonistic action of levetin–M/7.5 NaCl upon the aggultinative substance prepared by extraction of the ground eggs was not to be seen, even if five times volume of levetin–M/7.5 NaCl were added.

Although various attempts were made to find another anti-agglutinative substance which may be contained in the egg, no satisfactory results were obtained. But the author thinks that ovomucin–M/7.5 NaCl may probably inhibit the agglutinative action of lipovitellin and of the agglutinative substance prepared by exudation of the intact eggs. Further investigations are desirable.

Summary

1) The supernatant fluid exudated upon immersion of the intact eggs into alkaline distilled water (pH 8.5) at 70°C for one hour and by extraction of the ground eggs with distilled water (pH 7.0) at room temperature for the same length of time, caused an agglutination of the spermatozoa, But such an agglutination of the spermatozoa did not result from treatment of the supernatant fluid with an active carbon nor by dialysis

2) The above agglutinative substance showed two peaks of absorption spectrum at 265 mμ and 320 mμ. But these peaks were caused to disappear by treatment of the substance with an active carbon and by dialysis.

3) The lipovitellin–M/7.5 NaCl prepared from the whole yolk of rainbow trout eggs, caused an agglutination of the spermatozoa, but such an agglutination could not be detected as caused by vitellin–M/7.5 NaCl.

4) The agglutinative action of a lipovitellin upon the spermatozoa was neutralized by addition of two times volume of levetin–M/7.5 NaCl. But the supernatant fluid exudated as a result of immersion of the intact eggs into alkaline distilled water at 70°C for one hour, could not be obtained even if an addition was made of five times volume of levetin–M/7.5 NaCl.

References

1) Tyler, A.: *Physiol. Rev.*, **28** (2), 180 (1948).
2) Glaser, O.: *Biol. Bull.*, **41**, 63 (1921).
3) Hartman, M., F. G. Meden, R. Kuhn and H. J. Bielig: *Z. Naturforsch.*, **2**, 330 (1947).
4) Hamano, S.: *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **5** (2), 91 (1957).
5) ——.: *Physiol. Ecol.*, **3** (1/2), 43 (1949).

ON LATER ADDITION OF PERIBLAST NUCLEUS IN EMBRYO OF THE MEDAKA, *ORYZIAS LATIPES*

Hideo Gamo*

(Received Nov. 21, 1960)

It is a general understanding that the origin of periblast nucleus of the teleostean egg is the nucleus of marginal cell. They multiply mitotically until late blastula stage, after which amitotically. The author found another way of their number increase in embryos of a fresh-water fish, the medaka, *Oryzias latipes*.

Material and Methods

Domesticated orange strain was used. Naturally spawned eggs were fixed with Bouin's picro-formol *in toto* or having dechorionated with the hatching enzyme of the same species beforehand. Care was taken to keep the temperature of paraffin bath under 60°C. Delafield's hematoxylin was solely used. Matui's normal table[1] was used for the identification of developmental stages.

Observation and Consideration

In gastrula stage, when mesentoderm cells appear in the blastocoel, some of them are found directly contacted with periblast nuclei being imbedded in the periblast partially or totally. This kind of figure can be found also in later stages and the author found it even in the stage when the blood circulation starts and the tail begins to extend beyond the yolk (St. 26) (Figs. 1, 2, 5). Also it is often encountered that some of these cells contacted by each periblast nucleus are swollen both in cellular and nuclear size. The nucleus of such a swollen cell is of very similar appearance with that of the periblast nucleus, even in staining feature. The cell boundary of this swollen cell is often very dim and scarcely recognizable (Figs. 3, 4).

Periblast nuclei of the sea bass which have ceased the mitotic division at late blastula stage increase in size, become irregular shaped, greatly vacuolated and flattened. (Wilson, 1891)[2]. This is also true for periblast nuclei of the medaka and the author considers that the same process of change is repeated by nuclei in those cells contacted by periblast nuclei. The only difference is the existence and disappearance of cell boundary of those cells. The cause of change is probably the nutrient transmission.

The author considers that nuclei of some blastomeric cells are changed secondarily to periblast nuclei under the direct influence of elder periblast nuclei and this is another way of the increase in number of periblast nuclei besides their addition by the fusion of marginal cells and later division of nuclei thus added, so it is the second

* Department of Biology, Aichi Gakugei University, Okazaki, Japan. (岡崎市 愛知学芸大学 生物学教室 蒲生英男)

fusion of blastomeric element.

The author appreciates the kind encouragement of Prof. Dr. T. Yamamoto of Nagoya University.

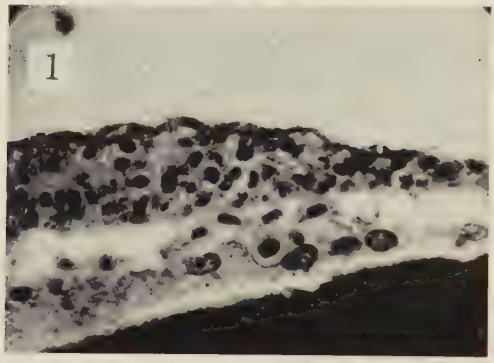
Summary

A new way of addition of periblast nuclei after the gastrula stage, other than the fusion of marginal cells and the nuclear division, was found in embryos of a fresh-water teleost, the medaka, *Oryzias latipes*.

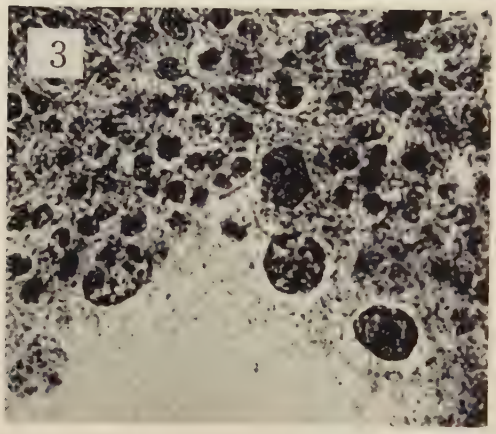
Some blastomeric cells which are directly contacted by periblast nuclei after the gastrula stage, even when the circulation and tail extension begin, are swollen both in cellular and nuclear size. Their nuclei often attain almost the same feature as the periblast nuclei in size, shape and staining. Cell boundary is also dim sometimes. The author considers that this is another way of addition of periblast nuclei.

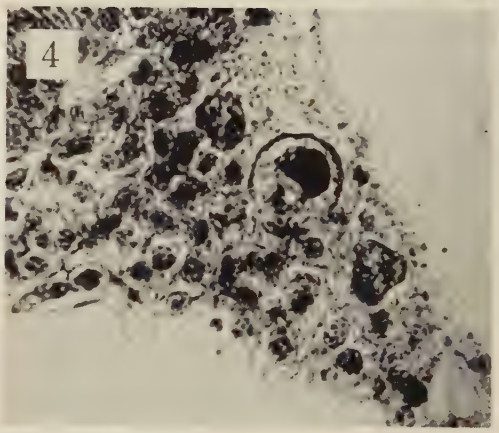
References

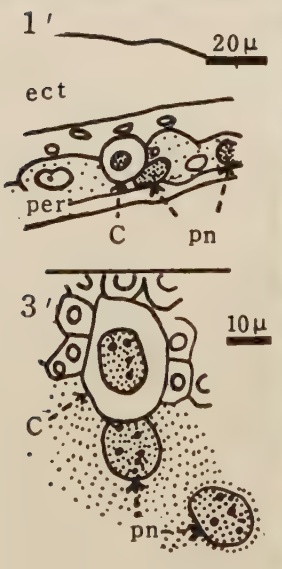
1) Matui, K.: Illustration of the normal course of development in the fish, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Morph.* (Jikken Keitaigaku), **5**:33-42 (in Japanese) (1949).
2) Wilson, H.: The embryology of the sea bass, *Serranus atrarius*. *Bull. U. S. Fish Commission*, **9**:209-227 (1891).

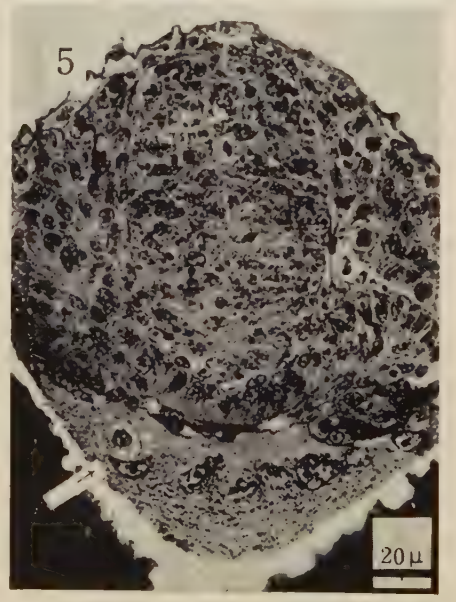

1

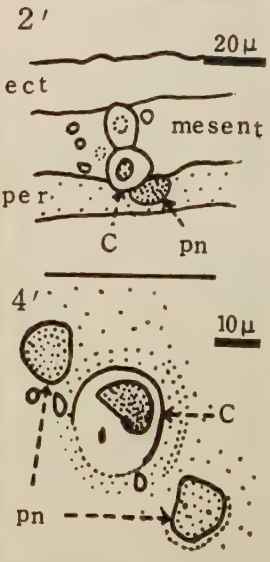
2


3


4


1′
20μ
ect
per
C
pn
3′
10μ
C
C
pn


5
20μ


2′
20μ
ect
mesent
per
C
pn
4′
10μ
C
pn

Explanation of Figures

Abbreviations C: cell contacting with periblast nucleus, ect: ectoderm, mesent: mesentoderm, per: periblast, pn: periblast nucleus.

Figs. 1, 2: Late gastrula stage when embryonic body starts formation and blastopore is still open (St. 17). (Embryo No. 17–57–II–L)

Figs. 1′, 2′: Contours of Figs. 1 and 2 respectively. The cells (C) in contact with periblast nuclei are rather larger but they are not necessarily enlarged by the contact because it often happens that some large cells are also found at some distance from these nuclei.

Figs. 3, 4: Stage when the eye vesicle is being formed and blastopore just closed (St. 19). (Embryo No. 19–57–IV–D)

Figs, 3′ 4′: Contours of Figs. 3 and 4 respectively. The cells (C) in contact with or close to periblast nuclei are swollen in the cell body and the feature of nuclei is very similar to that of the periblast nucleus.

Fig. 5: Stage of six myotomes, depression in eye vesicle and ear vesicle being formed (St. 21). (Embryo No. 21–58–IV–C) Cross section at 50% from the posterior end where the neural keel is fairly prominent. A conspicuous cell is imbedded within the periblast (indicated with an arrow) being directly contacted by one of periblast nuclei.

ON THE POLYINVAGINATION IN EMBRYO OF A TELEOST, THE MEDAKA, *ORYZIAS LATIPES*

Hideo Gamo*

(Received Nov. 21, 1960)

The polyinvagination in early development of the teleost has not been recognized before the early neurula stage. The author found it in early gastrula stage of a fresh-water teleost, the medaka, *Oryzias latipes*.

Material and Methods

Domesticated orange strain was used. Naturally spawned eggs were fixed *in toto* in Bouin's picro-formol. Care was taken to keep the temperature of paraffin bath under 60°C. Delafield's hematoxylin was solely used for staining. Double staining is useless because both the nucleus and cytoplasm are stained in the same way in such early stages. Matui's normal table[3] of the developmental stage of this species was used for the identification of stages.

Observation and Consideration

Observation of sections of the early gastrula stages (Sts. 14-15) reveals some disorder of the arrangement of blastomeres all over the blastodisc and often some cells are just under these disorders (Figs. 3, 4, 5, 6). The portion of epiderm at the opposite end of this disorder is often depressed. Sometimes some intercellular space is left near this disorder. Ordinary invagination through the blastopore is also observed. However, those cells sent into the blastocoel by the ordinary invagination and those by the above-mentioned type can not be distinguished from each other in the mesentoderm. Nothing is differentiated in the blastodisc except a slight thickening at the posterior end.

It is a generally known fact in teleost that some ectodermal cells at the dorsolateral edge of the neural keel migrate ventrally into the blastocoel and form the neural crest at the stage when the neural keel is being formed. (Wilson,[4] sea bass; Mahon & Hoar,[2] chum salmon; Kajishima,[1] goldfish). This stage corresponds to St. 17 of the medaka and the same figure is observed also in this species. The present observation is concerned with the early gastrula of which no neural keel is formed yet (St. 14). The observation described is probably of the migration of some blastoderm cells into the blastocoel and corresponds to the polyinvagination or the delamination already known in Reptilia and Aves in their late blastula stages.

The author concludes that the phenomena of polyinvagination occurs also in the

* Department of Biology, Aichi Gakugei University, Okazaki, Japan. (岡崎市 愛知学芸大学 生物学教室 蒲生英男)

teleost in early gastrula stage and assumes that the neural crest formation in early neurula stage is a partial descendant of this general polyinvagination.

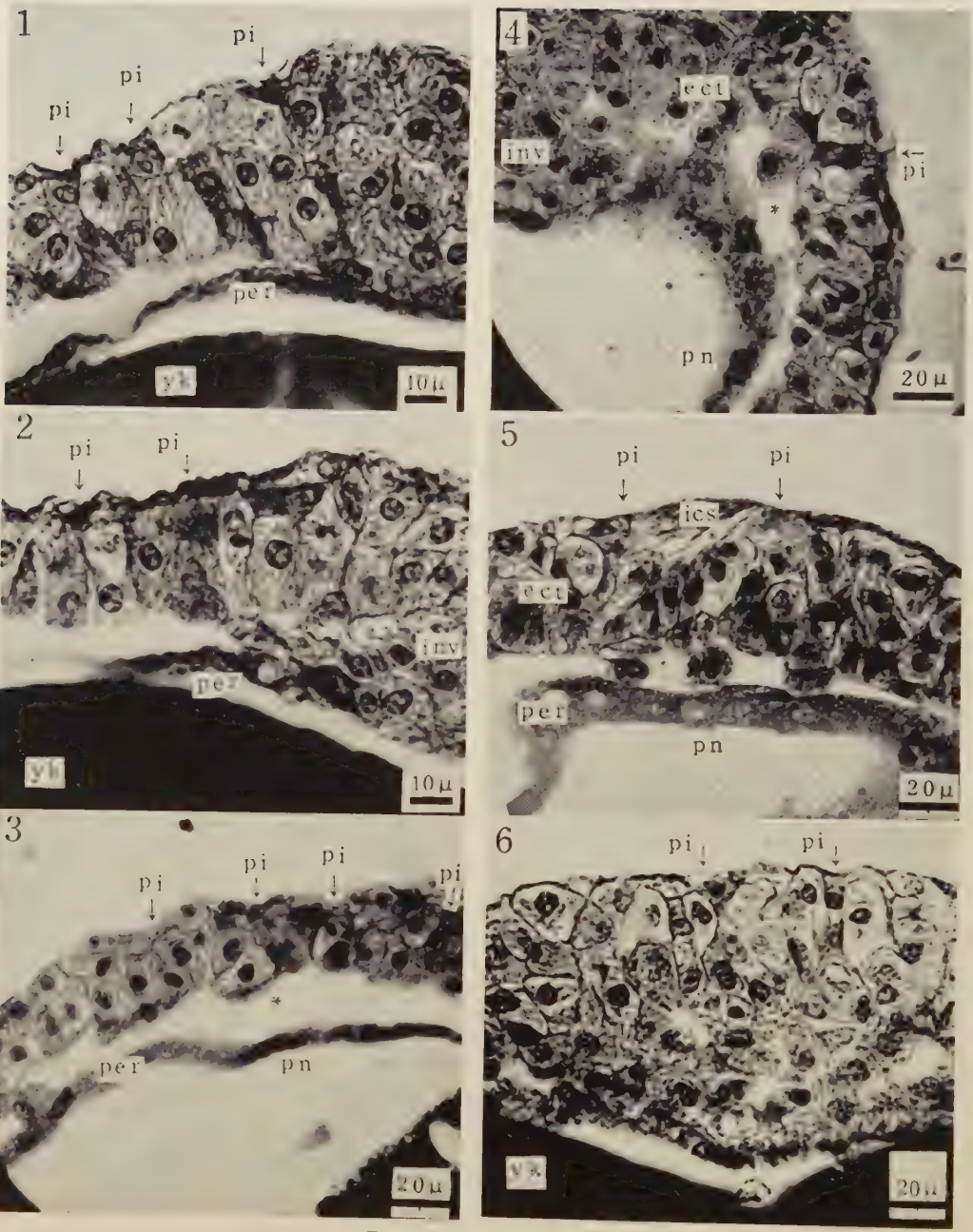
The author appreciates the kind encouragement of Prof. Dr. T. Yamamoto of Nagoya University.

Summary

Many figures of the polyinvagination are observed all over the blastodisc in early gastrulae of a teleost, the medaka, *Oryzias latipes*. This is different from the neural crest formation in early neurula which is universal in teleost. The author considers that the teleost also has a possibility of two kinds of course for blastodisc cells to migrate into the blastocoel at the blastula stage, that is, the ordinary invagination through the blastopore and the polyinvagination. Besides he assumes that the neural crest formation in the neurula stage is a partial descendant of the general polyinvagination in the gastrula stage.

References

1) Kajishima, T.: Regional differences in pigment cell formation of the embryonic shield of goldfish. *Embryologia*, **4**: 133-147 (1958).
2) Mahon, H. F. and W. S. Hoar: The early development of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *J. Morph.*, **98**: 1-47 (1956).
3) Matui, K.: Illustration of the normal course of development in the fish, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Morph.* (Jikken Keitaigaku), **5**: 33-42. (in Japanese) (1949 .
4) Wilson, H.: The embryology of the sea bass, *Serranus atrarius*. *Bull. U. S. Fish Commission*, **9**: 209-277 (1891).



Explanation of Figures

Abbreviations ect: ectoderm, ics: intercellular space inv: invagination, per: periblast, pi: polyinvagination, pn: periblast nucleus, yk: yolk

Figs. 1, 2: Gastrulation beginning (St. 14) (Embryo No. 14 58-XII-G) Longitudinal section near blastopore. No mesentoderm cell yet. Several dislocations are conspicuous besides the ordinary invagination.

Figs. 3, 4: Gastrulation beginning (St. 14) (Embryo No. 14-56-XII L) Longitudinal section. Fig. 3 is middle portion of body and Fig. 4 is posterior portion near blastopore. At least one cell (*) in each figure is recognizable to have just slipped out of the blastoderm or ectoderm, under each polyinvagination figure.

Fig. 5: Gastrulation beginning (St. 14) (Embryo No. 14 56 XII-A). Cross section. Three cells are under disorders of cell arrangement in the blastoderm or ectoderm.

Fig. 6: Gastrulation proceeds (St. 15) (Embryo No. 15 58 XII B). Cross section in front of the invaginating portion. Mesentoderm cells are dislocated into blastocoel by the polyinvagination in blastoderm or ectoderm, not by the invagination through blastopore.

緑藻類の化学的研究—III.
「アオノリ」,「アナアオサ」およびその粘質物の無機成分について

三田喜代

(1960年9月9日受理)

CHEMICAL STUDIES ON THE GREEN SEAWEED—III.
ON THE INORGANIC COMPONENTS OF *ENTEROMORPHA COMPRESSA*, *ULVA PERTUSA* AND THEIR MUCILAGES

Kiyo MITA*

Succeeding to the previous paper, in which the elemental composition of ashes of a red seaweed, *Gloiopeltis furcata*, and its mucilage was given, the present report deals with that of green seaweeds. The specimens were two kinds of green seaweed, *Enteromorpha compressa*, and *Ulva pertusa*, collected from Hiroshima Bay in January and May and mucilages extracted with hot water.

These materials were ashed in an oven below 500°C, and the mineral components were analyzed by the usual method (Table 1) and the arc spectrum analysis (Table 2).

Some differences were observed between these green seaweeds and the red seaweed previously tested in the content of Mg and Fe, the former being more rich in the metals, especially in Mg. The arc spectrum analysis showed the presence of trace elements such as Ti, Cu, Mn and B in both species.

The main components in the ashes of mucilages were found to be Mg, Na and S, and the last element was proved to be present as sulfate. These results suggest that the mucilage of green seaweed consists of Na and Mg salts of sulfate ester of polysaccharide, as that of red seaweed does.

緑藻類の化学に関しては，三宅[1]，林[2]，柳川[3]，PERCIVAL[4-6]等の粘質物に関する報告はあるが，その粘質物の無機成分についての報告は少ない。著者は緑藻類の粘質物の化学構造を解明する目的で「アオノリ」,「アナアオサ」から抽出した粘質物の化学的研究を行なつているが，無機成分について，さきに著者が報告した「フノリ」粘質物の無機成分[7]と比較検討し，若干の知見を得たので報告する。

実　　験

試　料

アオノリ (*Enteromorpha compressa*)，アナアオサ (*Ulva pertusa*) は1954年広島湾宇品港岸で採取したものである。藻体を水で塩素の反応の消失するまで，手早く洗滌して，塩分，土砂等を除去した。

粘質物の調製

水で洗滌した「アオノリ」,「アナアオサ」を肉挽器にかけ，50倍量の蒸留水を加えて，沸騰水浴中で3時間，時々攪拌しながら加熱する。木綿袋で沪過，沪液を更に羽二重を用いて吸引沪過する。沪液は減圧で濃縮後，約5倍量の無水アルコール中に激しく攪拌しながら注入する。塊状となつて沈殿する粘質物を綿布上

* 広島女子短期大学 (Hiroshima Women's Junior College, Ujinamachi, Hiroshima).

に集め圧搾して，液分を除き，減圧乾燥する。淡黄色の粗粘質物を熱水に溶かし沪過できる程度の濃厚溶液にして一昼夜放置後，羽二重を用いて沪過する。沪液は減圧濃縮後，10 倍量の無水アルコール中に攪拌しながら注入する。淡黄白色の沈殿物を沪紙上に集め圧搾して，液分を除き，無水アルコールに浸漬して，圧搾し，エーテルに浸漬し，圧搾して減圧乾燥する。上記操作を 2 回繰り返して得た粘質物はそれぞれ淡黄白色の粉末である。

粘質物および充分風乾した藻体は小型電気炉を用いて，なるべく低温で（最高 500°C）灰化した後普通原素は常法[8] で分析した。

一定量の灰分を三角フラスコに入れ少量の濃硝酸で湿し沸騰水浴上でしばらく温めて後濃塩酸を加える。蒸発させ，残渣に少量の濃塩酸を加え，つぎに温湯を加えて希釈し，秤量した沪紙で沪過し沈殿と沪液とに分ける。沈殿の方からは珪素を無水珪酸として分離定量する。沪液は原溶液として諸成分を分離定量する。すなわち硫黄は硫酸バリウムとして，カルシウムは酢酸酸性法によつて蓚酸カルシウムとして，マグネシウムは焦性燐酸マグネシウム法によつて焦性燐酸マグネシウムとして，鉄はアンモニア法によつて酸化第二鉄として，アルミニウムはオキシン法によつて酸化アルミニウムとして，燐はモリブデイック法によつて燐酸としてそれぞれ定量した。カリウム・ナトリウムはまづ塩化カリウムと塩化ナトリウムの合量を求め，過塩素酸法によつてカリウム塩を分離定量しナトリウム塩を差引算出する方法によつて定量した。

微量原素は灰分を炭素極に充塡し，通常の孤光分光分析法で分析を行なつた。

結果および考察

灰分中の普通原素の含量を Table 1 に示し，微量原素を Table 2 に示す。

Table 1. The content of mineral components in green seaweeds and their mucilages (% of ash.)

	E. compressa	Mucilage from *E. compressa*	*U. pertusa*	Mucilage from *U. pertusa*
ash*	16.0%	10.9%	19.0%	13.6%
Na	6.4	9.8	4.9	8.1
K	2.2	1.2	2.9	1.1
Si	1.8	1.1	1.7	1.0
P	0.8	0.2	0.6	0.1
Al	0.9	0.1	0.8	0.1
Fe	1.5	0.8	1.6	0.4
Ca	5.3	2.1	1.8	1.2
Mg	20.5	23.7	22.1	24.0
S	12.3	11.9	17.8	17.5

* on dry basis.

Table 2 によれば，Table 1 に示した普通原素の分析値の傾向がよくあらわれており，また原藻中には Cu, Ti, Mn, B も存在していることがわかる。

海藻類の成分含有量は，同一場所，同一種類においても採集時季により，藻体の化学的組成がはなはだしく異なつてくることは第 I 報[9] で報告した通りである。したがつて本実験の「アオノリ」は最適採集期の 1 月 21 日，「アナアオサ」は 5 月 21 日に採集したものを使用した。

粘質物の硫黄の形態：精製粘質物の水溶液に $BaCl_2$ を加えても $BaSO_4$ を生じないが塩酸で加水分解後は硫酸イオンの反応が顕著に現われる。故に遊離の硫酸は精製粘質物には含まれないものと考える。

Table 2. Semi-quantitative analysis of mineral components in green seaweeds and their mucilages by the arc spectrum analysis.

	E. compressa	Mucilage from *E. compressa*	*U. pertusa*	Mucilage from *U. pertusa*
Na	++++++	++++	++++++	++++
K	++	+	++	+
Si	+++	++	+++	+
P	++	+	++	+
Al	++	+	++	+
Fe	+++++	+++	+++++	+
Ca	++++	++	+++	+
Mg	+++++++++	++++++	+++++++++	++++++
Mn	+		+	
B	++		++	
Cu	+		+	
Ti	+		+	

+: Density of spectrum line.

つぎに精製粘質物 0.5g に 50 倍量の 1N-HCl を加え，還流冷却器を附し，沸騰水浴内で4時間加熱し沪液に $BaCl_2$ を加えて硫酸を $BaSO_4$ として定量した。「アオノリ」の SO_3 は 13.09%，S に換算して 5.24%，「アナアオサ」の SO_3 は 18.70%，S に換算して 7.49% である。また別に PREGL 燃焼法により全硫黄を定量すると，S はそれぞれ 5.28%，7.52%．SO_3 に換算して 13.17%，18.76%．すなわち，両方法による S 量は大体一致する。故に，硫黄はすべて硫酸として存在することがわかり，また逆に 1N-HCl で4時間加水分解すれば完全に硫酸を分離することがわかつた。

以上の結果から「アオノリ」，「アナアオサ」およびそれらの粘質物に含まれている無機成分については同じ原素を含有しているが，ナトリウム，カルシウムは「アオノリ」の方が多く硫黄，マグネシウムはむしろ「アナアオサ」の方が多い。灰分量も「アナアオサ」の方が多い。また「アオノリ」，「アナアオサ」原藻の無機成分は「フノリ」原藻と同様であるが，鉄特にマグネシウムの含量が大きい。粘質物中の灰分も「フノリ」の場合と同様粘黄を多く含み，すべて硫酸型で，これに結合している金属はマグネシウム，ナトリウムと考えられる。

緑藻類の粘質物は紅藻類の粘質物同様多糖類[10]の硫酸エステルのマグネシウムあるいはナトリウム塩であろうと推論した。

要　　約

1. 「アオノリ」，「アナアオサ」およびそれらの粘質物の無機成分については相異は認められないが，含有量に多少の差を認める。すなわち「アオノリ」においては灰分量は少く，ナトリウム，カルシウムは多い。硫黄，マグネシウムは「アナアオサ」に多い。

2. 「アオノリ」，「アナアオサ」原藻の無機成分は「フノリ」原藻の無機成分と同様であるが鉄特にマグネシウムの含量が大きく，粘質物においてもマグネシウムの含量は大きい。微量無機成分として Ti, Cu, Mn, B を含有することは「フノリ」同様である。

3. 両者とも粘質物を構成している主要無機成分は全く同じでマグネシウム，ナトリウム，硫黄で硫黄の形態は硫酸型である。

終りに終始御懇篤な御指導を賜わつた故増本文吉博士に厚く感謝の意を表するとともに，海藻採取ならびに実験に協力された本校副手永井君子，奥田みさを両氏に深謝する。

なお本研究は文部省科学研究費の一部によつて行なつたものである。

文　　献

1) 三宅： 熱帯農会，**10 巻，第 3 号** (1938).
2) 林・永田・山田： 岐阜大農報，**5**，90 (1955).
3) 柳川・中西： 同志社工誌，**2**，65 (1951).
4) I. M. MACKIE and E. PERCIVAL: *J. Chem. Soc.*, 1151～1156 (1959).
5) J. J. O'DONNELL and E. PERCIVAL: *J. Chem. Soc.*, 1739～1743 (1959).
6) J. J. O'DONNELL and E. PERCIVAL: *J. Chem. Soc.*, 2168～2178 (1959).
7) 三田： 本誌，**22**，558～560 (1957).
8) 東京大学農学部農芸化学教室： 実験農芸化学上巻 p. 7 (昭和 33 年).
9) 三田： 本誌，**26**，1010～1012 (1960).
10) 三田： 投稿中.

食品防腐剤に関する研究—III.

抗生物質に対する *Proteus morganii* の耐性獲得について

興津知明・河端俊治

(1960 年 11 月 5 日受理)

STUDIES ON FOOD PRESERVATIVES—III. ACQUISITION OF ANTIBIOTIC-RESISTANCE BY *PROTEUS MORGANII*

Tomoaki Okitsu* and Toshiharu Kawabata**

Acquisition of resistance against chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC) by *Proteus morganii*, the causative organism of allergy-like food poisoning, has been studied.

In addition, the influence of these antibiotics upon the formation of histamine and the activities of *l*-histidine decarboxylase of the washed cell suspensions has been investigated with the resistant and the original sensitive strains.

Results obtained may be summarized as follows:

1. Four strains of *P. morganii* were exposed to a constant dose of each drug, either a maximum tolerance level or 0.1 ppm. The latter dose is the maximum permissible residual of CTC in fish regulated by the Japanese Food Sanitation Law.

After 60 successive subcultures were made in nutrient broth containing either antibiotic, the resistance increased 4 to 16-fold at a miximum tolerance level and 2 to 8-fold at 0.1 ppm.

2. A complete cross-resistance between CTC and OTC was observed. A slight cross-resistance against chloramphenycol was recorded with the OTC or CTC-resistant organisms, while that against streptomycin was not appreciable.

3. No marked difference in the rate of formation of histamine was observed between resistant and sensitive organisms when grown in the mackerel infusion.

4. Ten or 100 ppm of either drug did not interfere the activity of *l*-histidine decarboxylase of the washed cell suspensions of both resistant and sensitive organisms.

ま え が き

現在水産食品の一部に対しては，ニトロフラゾーン (NFS)，ニトロフリルアクリル酸アミド (NFA) などの食品防腐剤の使用が許可され，また一部の魚類の鮮度保持にクロルテトラサイクリン (CTC) の使用が薬品氷の形で許可されている。著者らは前報[1),2)]においてサンマ，サバ等の赤身の魚種に多発するアレルギー様食中毒の食品防腐剤および抗生物質 (CTC, OTC) による防止の可能性を検討した結果，許可防腐剤中ではその許可濃度範囲内で NFA, NFS にやや効果がみられた。一方アレルギー様食中毒原因菌である[3)] *P. morganii* は CTC, OTC の低濃度で抑制される。しかもこの細菌の魚肉懸濁中でのヒスタミン産生は，基礎培地におけるそれぞれの最小発育阻止濃度よりはるかに低濃度の両抗生物質によつて抑制されることが明らかになつた。このように抗生物質の鮮魚での使用は鮮度保持のみでなく食中毒防止の補助的手段ともなる

* 埼玉県衛生研究所 (Saitama Prefectural Hygienic Laboratory, Omiya, Saitama Pref., Japan).
** 国立予防衛生研究所 (Department of Food Control, National Institute of Health, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan).

点で注目すべきであるが，他方近時 CTC などの抗生物質の使用は赤痢菌その他の腸内細菌の耐性獲得という点で治療上や公衆衛生上から多大の関心が寄せられている。したがつて魚類鮮度保持およびアレルギー様食中毒防止に抗生物質を使用する場合にも，腐敗細菌や中毒原因菌の耐性獲得についても十分に検討されなければならない。

P. morganii の耐性獲得についての研究例ははなはだ少なく，著者らの研究グループの一員である鈴木[4]のストレプトマイシン等に対する耐性獲得についての報告があるに過ぎない。抗生物質を食品の鮮度保持に使用する場合には，治療の場合と異なり使用量も遙かに少く，また食品中の残存量は僅少であるので，特に微量の抗生物質との接触による耐性の誘起が問題と考えられる。そこで本報では *P. morganii* 4 株について CTC および OTC に対する耐性獲得を恒量法を用いて検討した。抗生物質の濃度としては，この細菌の最大耐量および 0.1 ppm (CTC について法律で規定されている食品中の最大残存量) の濃度における耐性獲得の状態を検討した。更に得られた耐性株について他の抗生物質との交叉耐性および菌のヒスチジン脱炭酸能におよぼす影響について検討した結果を記載する。

実　　験

実験 1. *P. morganii* の CTC および OTC に対する耐性獲得

1. 供試菌株

P. morganii TU-2[2]
〃 S-1[2]
〃 # 71[2]
〃 No. 325[2]

2. 供試抗生物質

クロルテトラサイクリン塩酸塩 (CTC)　日本レダリー製
オキシテトラサイクリン塩酸塩 (OTC)　台糖ファイザー製

3. 実験方法

(1) 基礎培地: Difco 製 nutrient broth を pH 7.0 に修正して使用した。

(2) 抗生物質供試液の調製: CTC および OTC 各 40 mg を滅菌蒸留水 100 ml にとかし，適宜滅菌蒸留水で稀釈したもの 1 ml を nutrient broth 9 ml に加えた。

(3) 培養方法: 予め 3 代 nutrient broth に継代培養した供試菌の 1 白金耳量を抗生物質を含む培地にうえ，毎日継代培養を 60 代続けるとともに大体 6 日目毎に最大耐量 (maximum tolerance level) を測定した。(37°C, 24 時間で判定)

抗生物質濃度は使用菌株について予め測定した最大耐量（この濃度で菌の生育がきわめて微弱である場合はその 2 分の 1）および 0.1 ppm の 2 種を用いた。また対照として抗生物質を含まない基礎培地にも同じく 60 代継代培養を行なつた。

また最大耐量で 50 代継代培養したものを抗生物質を含まない培地に移植し，以後 25 代同培地に継代培養し最大耐量を測定した。

4. 実験結果

使用菌株における耐性獲得の様相は Fig. 1 および Fig. 2 に示す通りである。すなわち CTC においては最大耐量で 60 代継代培養したものは 4～8 倍，0.1 ppm で継代培養したものは 2～8 倍に最大耐量が増加した。OTC においても同様であり，最大耐量で継代培養したものは 4～16 倍，0.1 ppm 継代培養したものは 2～8 倍に最大耐量が増加した。また 50 代で抗生物質を含まない基礎培地に移植し，以後 25 代毎日継代培養したものは，図中の矢印および点線で示されているが，一旦獲得した耐性は不変かあるいは 2 分のに減少する程度で比較的安定であつた。

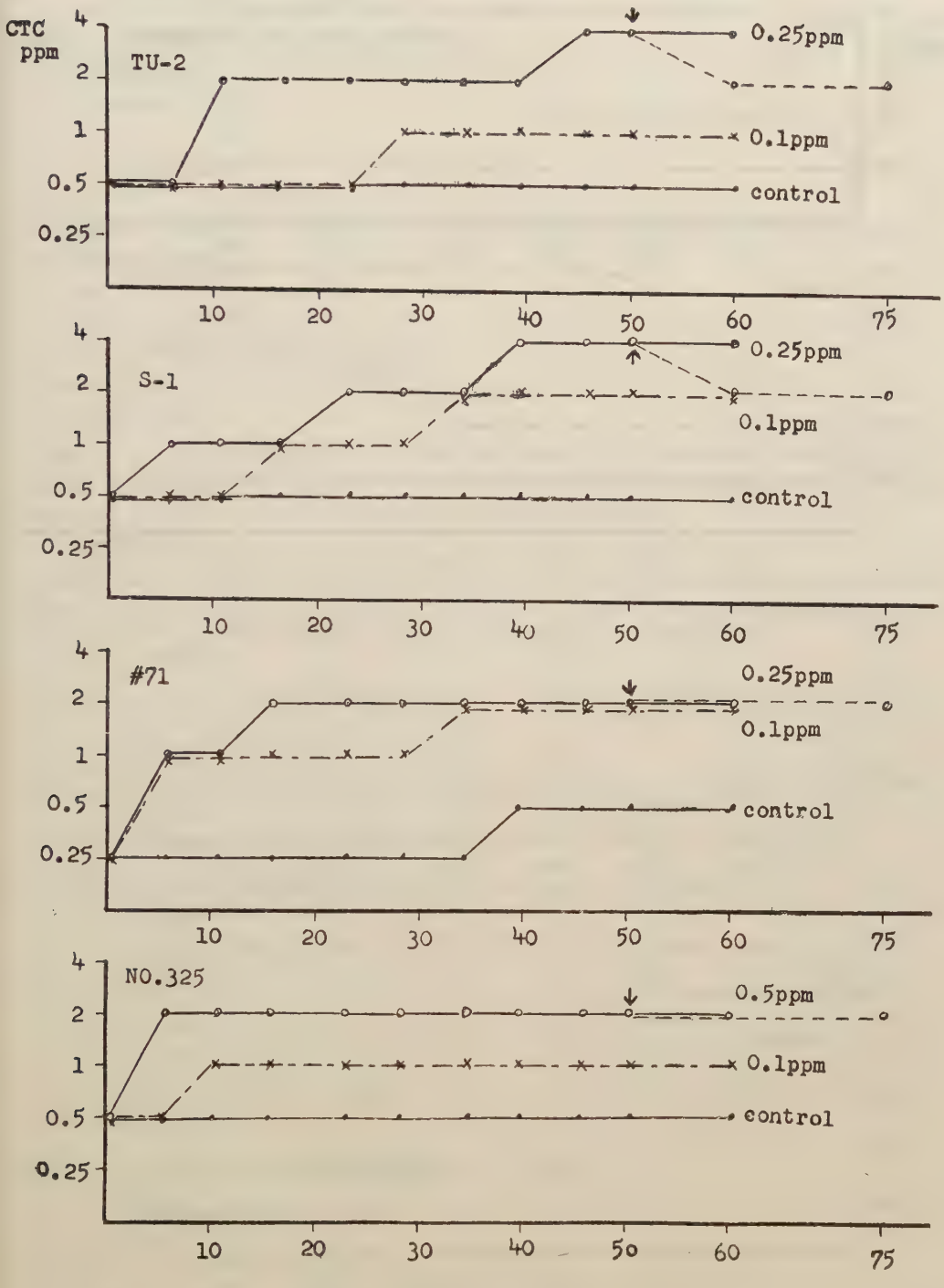


Fig. 1. Change in Maximum Tolerance Level of *P. moaganii* to CTC.

Arrows represent the time of transplantation to the basal medium and the following dotted lines indicate the change in tolerance level of organisms.

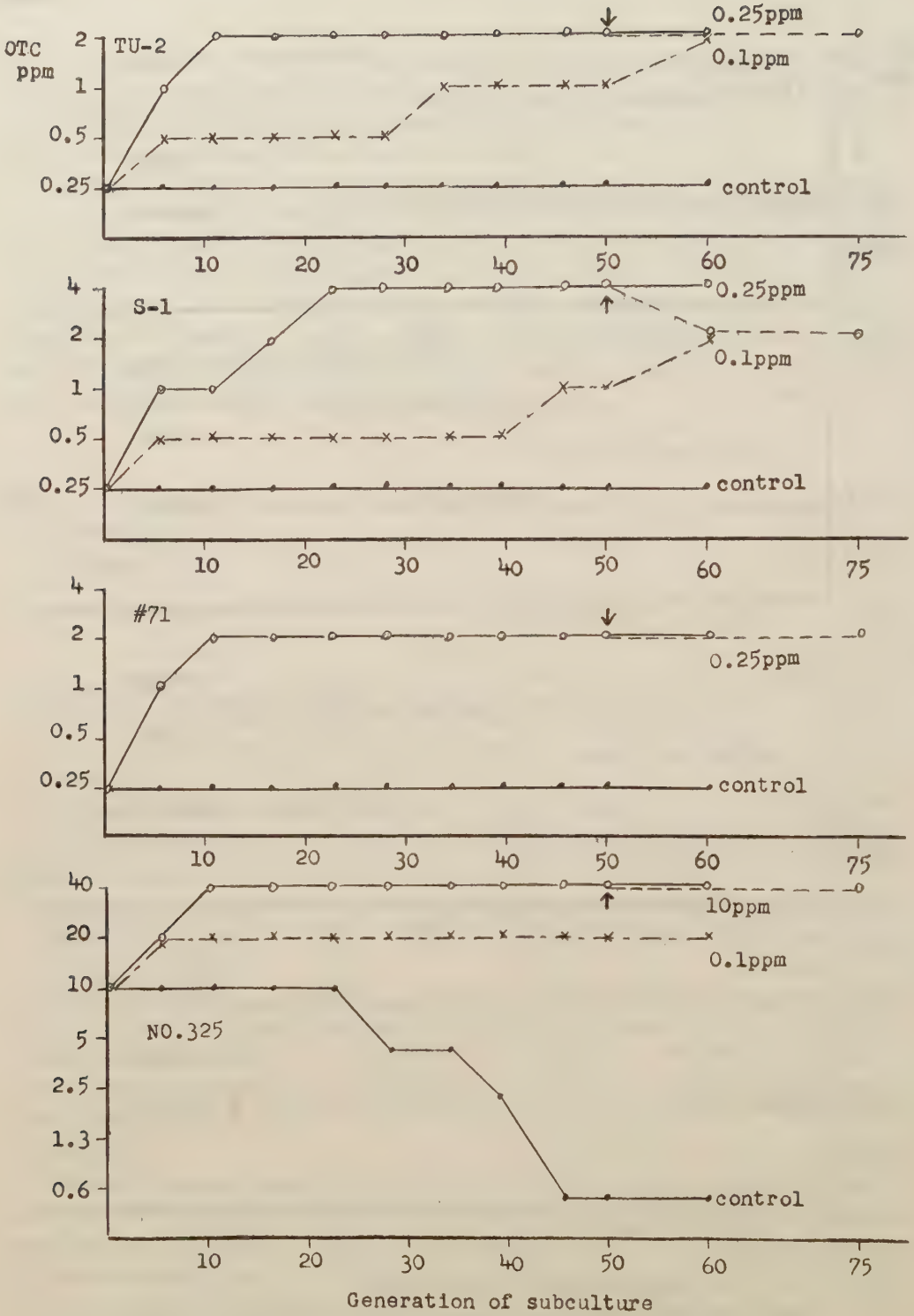


Fig. 2. Change in Maximum Tolerance Level of *P. morganii* to OTC.

Arrows represent the time of transplantation to the basal medium and the following dotted lines indicate the change in tolerance level of organisms.

実験 2. 耐性獲得株の他の抗生物質との交叉耐性

1. 供試菌株

P. morganii TU-2
〃 S-1
〃 # 71
〃 No. 325

上記4株につき実験1で CTC および OTC の最大耐量に 60 代継代培養した耐性株および対照株。

2. 供試抗生物質

CTC
OTC
CM（クロラムフェニコール 山之内製薬製）
SM（硫酸ストレプトマイシン 協和醗酵製）

3. 実験方法

実験1において最大耐量を測定したと同じ方法で他の抗生物質に対する最大耐量を測定した。すなわち，CTC を含む培地に継代培養したものについては OTC, CM, SM に対する最大耐量，OTC を含む培地に継代培養したものについては CTC, CM, SM に対する最大耐量を測定した。

4. 実験結果

結果は Table 1, Table 2 に示すごとくであつて，CTC と OTC の間には完全な交叉耐性が成立し，この両者と CM との間には軽い交叉耐性が成立したが，両者と SM との間には交叉耐性は認められなかつた。

Table 1. Cross-resistance of CTC Resistant *P. morganii* against OTC, CM or SM.

Strain		CTC	OTC	CM	SM
TU-2	Original	0.5	0.25	2.5	0.31
	Resist.	4.0	2.0	5.0	0.31
S-1	Original	0.5	0.25	5.0	0.31
	Resist.	4.0	2.0	10	0.63
# 71	Original	0.25	0.25	1.3	0.31
	Resist.	2.0	2.0	10	0.31
No. 325	Original	0.5	10	2.5	0.13
	Resist.	2.0	40	5.0	0.06

(Results are expressed as maximum tolerance level in ppm.)

Table 2. Cross-resistance of OTC Resistant *P. morganii* against CTC, CM or SM.

Strain		OTC	CTC	CM	SM
TU-2	Original	0.25	0.5	2.5	0.31
	Resist.	2.0	2.0	5.0	0.31
S-1	Original	0.25	0.5	5.0	0.31
	Resist.	4.0	2.0	5.0	0.63
# 71	Original	0.25	0.25	1.3	0.31
	Resist.	2.0	4.0	5.0	0.13
No. 325	Original	10	0.5	2.5	0.13
	Resist.	40	4.0	5.0	0.13

(Results are expressed as maximum tolerance level in ppm.)

実験 3. サバ肉エキス中における耐性獲得株のヒスタミン産生能

1. 供試菌株

P. morganii TU-2
〃 # 71

上記2株につき実験1で CTC および OTC の最大耐量に 60 代継代培養した耐性株および対照株。

2. 実験方法

各菌株をサバ肉エキス（調製法は第II報に同じ）にうえ，25°C に 72 時間培養後ヒスタミン量を河端ら[5]の方法によつて測定した。

3. 実験結果

ヒスタミン量は原料魚肉に対する mg% に換算した。その結果は Table 3 に示す通りであつて，対照株と耐性株との間にはほとんど差は認められなかつた。

Table 3. Comparison of the Rate of Histamine Formation between Original and Resistant Strains of *P. morganii* in Mackerel Infusion incubated at 25°C for 72 hours.

Strain		Histamine formed
TU-2	Original	359 mg%
	CTC-resist.	396 〃
	OTC-resist.	424 〃
# 71	Original	400 〃
	CTC-resist.	473 〃
	OTC-resist.	351 〃

実験 4. *P. morganii* の *l*-ヒスチジン脱炭酸酵素におよぼす CTC および OTC の影響

1. 供試菌株

実験3に同じ。

2. 供試抗生物質

CTC

OTC

3. 実験方法

（1） 集菌用培地： サバ肉エキス培地に 1% のブドウ糖を加え，pH 7.0 に修正して用いた。

（2） 培養および洗滌菌体懸濁液の調製： 河端・鈴木[6),7)]の方法に大体準じて調製した。すなわち供試菌をサバ肉エキスに2代，25°C で継代培養後，集菌用培地 100 ml に移植し，25°C に 24 時間培養後の菌体を 0°C，約 7000 G で 10 分間遠心して集菌し，生理的食塩水を用いて3回洗滌後，生理的食塩水を用いて懸濁液を作成した。菌体懸濁液は比色計 (630 mμ) で濁度を測定して濃度を一定にし，その一部についてケルダール法により窒素量を測定した。

（3） *l*-ヒスナジン脱炭酸酵素力価の測定法： 河端・鈴木の方法[6),7)]に準じてつぎの組成の反応混液を調製した。

菌体懸濁液	1 ml
M/50 *l*-ヒスチジン	1 ml
M-5 燐酸緩衝液	3 ml

上記を 37°C で1時間反応させた後 100°C で5分間加熱して反応を止め，10% トリクロル酢酸を等量加えて除蛋白し，河端らの方法[5)]によりヒスタミン量を測定した。脱炭酸能力価は菌体窒素 1 mg 当り 37°C で1時間に産生されるヒスタミン量 (mg) で表わした。

なお，CTC または OTC を添加する場合には，反応液中の濃度が所要濃度になるように緩衝液にとかして用いた。

4. 実験結果

結果は Table 4, Table 5 に示したが，耐性株および対照株の *l*-ヒスチジン脱炭酸酵素は 10 ppm, 10

Table 4. Effect of Addition of CTC upon the *l*-(−)-Histidine Decarboxylase of *P. morganii*.

Strain		Amount of CTC added		
		0 ppm	10 ppm	100 ppm
TU-2	Original	5.4	4.6	4.4
	CTC-resist.	5.6	6.0	6.4
# 71	Original	5.4	4.2	3.9
	CTC-resist.	3.9	3.2	3.4

Activities are expressed as, mg histamine/mg bacterial nitrogen/hr. at 37°C.

Table 5. Effect of Addition of OTC upon the *l*-(−)-Histidine Decarboxylase of *P. morganii*.

Strain		Amount of OTC added		
		0 ppm	10 ppm	100 ppm
TU-2	Original	5.4	4.9	5.4
	OTC-resist.	6.6	6.5	8.4
# 71	Original	5.4	4.4	4.4
	OTC-resist.	4.3	4.0	4.1

Activities are expressed as, mg histamine/mg bacterial nitrogen/hr. at 37°C.

ppm の CTC および OTC によつて阻害されなかつた。また *l*-ヒスチジン脱炭酸能は耐性株と対照株ではほとんど差は認められなかつた。

考　　察

一般に薬剤により細菌を *in vitro* で耐性化するには増量法と恒量法の2つの方法がある。食品中のように低い使用濃度，さらに残存量が微量であることを考慮すれば，治療剤として使用する場合と異なり階段的に濃度が上昇することは考えられないので，われわれの実験の目的には恒量法が実際に起りうる状態により近いと考えて，ここでは恒量法のみを用いた。

継代培養に用いる薬剤濃度は，一般に用いられている最大耐量と 0.1 ppm の濃度を用いた。CTC 氷を用いた場合に魚肉中における CTC の残存量は法律*で 0.1 ppm 以下と規定されているので，魚肉中においても 0.1 ppm の薬剤と細菌の接触はありうると考えてこの濃度についても実験を行なつたのである。一般にテトラサイクリン系の抗生物質はストレプトマイシン，ペニシリンなどと異なつて細菌の耐性獲得が少いといわれ，われわれのデータもそれを裏付けている。

P. morganii の CTC や OTC に対する耐性上昇の様式は，多くの細菌と薬剤との関係にみられるように[4),8),9)] stepwise に上昇し，毎日継代培養を 60 代続けることによつて，その最大耐量では最高 16 倍に上昇した。また 0.1 ppm で継代培養したものでも 2～8 倍に耐性が上昇した。これらの結果はペニシリン，ストレプトマイシンなどにくらべきわめて耐性の誘導が困難であることを示すものである。しかしながら実際に CTC 氷を用いた場合にもし船舶魚の運搬容器などに *P. morganii* が附着していて，それが長期間にわたつて微量の CTC に継続して接触すれば，きわめて緩除ではあるがその耐性の上昇が起る可能性を示すものである。したがつて船舶，容器器具の清潔保持という衛生上の原則は抗生物質使用によりますます強調されねばならない。またこれらの事実からみて，各種の魚肉腐敗細菌の耐性獲得についてもさらに検討が必要であると考えられる。

細菌の薬剤に対する耐性獲得の機作については諸説があるが，細菌の発育中に微量の抗生物質の存在により誘起された突然変異と考えることが現在最も妥当であるようである。これは耐性菌を再び抗生物質を含まない培地中で継代培養しても，耐性は変らないか，減少しても2分の1程度で，かなり安定であるという事実からも裏付けられる。

しかしながら，他の細菌の混在する状態においては，耐性菌の増殖が他の細菌に抑制されることによつて現象的に耐性菌が消失することは，十分その可能性が考えられるところである。耐性菌の生育力については *Pseudomonas fluorescens* を用いたつぎの実験において検討する予定である。

CTC と OTC の間に交叉耐性が成立することは，すでに赤痢菌[9)]，大腸菌[10)]等においては知られており，これはその構造が類似し，抗菌力が共通の作用基によるということから当然考えられることである。CM との交叉耐性については赤痢菌[9)]等の実験例があるが，その機作については現在定説はないようである。SM と全く交叉耐性が認められないことは，赤痢菌[9)]における場合と同様である。

P. morganii は CTC, OTC に耐性を獲得することにより，そのヒスタミン産生能，すなわちヒスチジン脱炭酸能への影響は認められなかつた。本実験においては耐性獲得といつてもその程度は低いものでありまた高度に耐性を獲得した他の細菌[8),9),11)]においても，その性状の著明な変化は極く一部にみられるに過ぎないことから当然考えられることである。Table 2 に示したように No. 325 株の対照株の OTC に対する最大耐量は継代培養中に著しく減少した。この菌は OTC に対してははじめから比較的耐性が高く，CTC に対しては他の菌株とほぼ同程度であつた。しかも継代培養中に OTC に対する耐性のみの低下が認められたのは特記に値する。しかし現在のところその理由については不明である。

細菌のヒスチジン脱炭酸酵素はアルデハイド試薬によつて強く阻害され[12)]，これは *P. morganii* につい

---

* 昭和 34 年 12 月 28 日　厚生省告示第号による。昭和 35 年 5 月 10 日　厚生省告示第 128 号により一部改正。

ても知られている[13]。他の薬剤によつては余り強く阻害されていない。CTC については 2×10^{-4}M（約 100 ppm）で大腸菌のコハク酸脱水素酵素を阻害する[14]ほか種々の酵素作用に対する阻害が実験されている。*P. morganii* のヒスチジン脱炭酸酵素に対する阻害については報告がないので実験を行なつたが，100 ppm までの CTC および OTC によつて対照株，耐性株とも阻害を受けなかつた。前報[2]において報告した *P. morganii* のヒスチジン脱炭酸酵素の形成は CTC, OTC によつて阻害されない点と考えあわせ，これらの抗生物質が存在するとき，*P. morganii* によるヒスタミン産生が低下するのは，抗生物質が細菌の発育を抑制するためであると考えられる。

総　　括

アレルギー様食中毒原因菌である *P. morganii* につき，抗生物質（CTC, OTC）に対する耐性獲得および抗生物質のヒスチジン脱炭酸酵素におよび影響について検討しつぎの結果を得た。

1. CTC, OTC に対し，*P. morganii* は最大耐量 60 代継代培養で 4～16 倍に，0.1 ppm 代継代培養で 2～8 倍に耐性が上昇し，その獲得した耐性は安定であつた。
2. CTC と OTC の間には完全に交叉耐性が成立し，この両者と CM との間には軽い交叉耐性が成立したが，SM とは全く交叉耐性を有しなかつた。
3. 耐性獲得によつて細菌のヒスチジン脱炭酸能はほとんど影響を受けなかつた。
4. 対照株および耐性株は 100 ppm までの CTC, OTC によりヒスチジン脱炭酸酵素作用の阻害を受けなかつた。

本実験を行うに当り，実験材料を提供された日本レダリー株式会社に謝意を表わす。

文　　献

1) 興津知明：本誌，**26**，797 (1960).
2) 興津知明：本誌，**26**，843 (1960).
3) 河端俊治・石坂公成・三浦利之・佐々木忠尚：本誌，**22**，41 (1956).
4) 鈴木　茂：日公衛，**7**，247 (1960).
5) 河端俊治・内田　大・赤野多恵子：本誌，**26**，1183 (1960).
6) 河端俊治・鈴木　茂：本誌，**25**，473 (1959).
7) 河端俊治・鈴木　茂：本誌，**25**，481 (1959).
8) 川口正典：日細菌，**12**，189 (1957).
9) 渡辺哲郎：日細菌，**14**，807 (1959).
10) 秋葉朝一郎・横田　健：未発表.
11) 鈴木　茂：日公衛，**7**，447 (1960).
12) 奥貫一男・稲垣　稔：赤堀四郎編“酵素研究会” Vol. 2, p. 724 (1956).
13) 鈴木　茂：日公衛，**7**，6 (1960).
14) 三浦義彰：日細菌，**13**，579 (1958).

MUSCLE EXTRACTS OF AQUATIC ANIMALS—IV. DISTRIBUTION OF NITROGENOUS CONSTITUENTS IN THE MUSCLE EXTRACTS OF AN ABALONE, *HALIOTIS GIGANTEA DISCUS* REEVE

Shōji KŌNOSU and Yasuhiko MAEDA*

(Received Nov. 8, 1960)

Succeeding to the previous papers,[1,2] in which the composition of free and combined amino acids in the muscle extracts of squid and prawn was given, the present report deals with the non-protein nitrogenous compounds in the muscle of an abalone, which is highly esteemed for the table in the Far Eastern countries. In this study, the authors have attempted to clarify the distribution of nitrogenous constituents in the muscle extracts as fully as possible and analyzed amino acids, trimethylammonium bases and acid soluble nucleotides. The data on free amino acids, glycine betaine, trimethylamine (TMA), trimethylamine oxide (TMO), adenosine monophosphate (AMP) and adenosine diphosphate (ADP) are presented.

Experimental

Material and preparation of test samples. Five males of an abalone, *Haliotis gigantea discus* REEVE, were collected at Shirahama in Chiba Prefecture on May 11th, 1959 and 300～500 g. in body weight. The foot and shell muscle were taken and frozen in dry ice within 30 minutes after catch, and brought to the laboratory. The tissues were coarsely minced and well mixed. The pooled material was divided into three portions, which were subjected respectively to proximate analysis and to preparation of trichloroacetic acid and perchloric acid extracts.

The trichloroacetic acid extracts were prepared for the determination of extractive-N, α-amino-N, free amino acids, glycine betaine, TMA and TMO as described in the previous paper,[3] and the perchloric acid extracts for acid soluble nucleotides according to the method reported by FUJITA *et al.*[4]

Analytical methods. Amino acids were separated chromatographically by the method of MOORE and STEIN[5] and estimated by the photometric ninhydrin method described by YEMM and COCKING.[6] Glycine betaine was determined by the method given in the previous paper,[3] the procedure to remove proline being omitted, because of the scarcity of this amino acids in the extracts. TMA and TMO were determined by the modified DYER method[7] and acid soluble nucleotides by the method reported from this laboratory.[4] Proximate analysis was carried out according to the usual methods.

* Lab. of Fish. Chem., Fac. of Agr., The Univ. of Tokyo (東京大学農学部:鴻巣章二・前田安彦).

Results and Discussion

The results of proximate analysis are given in Table 1. The proportion of extractive-N to total N was considerably high, being almost at the same level as that in the prawn muscle.[2)]

The amounts of various non-protein nitrogenous constituents in the abalone muscle are shown in Table 2. Of the acid soluble nucleotides, two adenine nucleotides, AMP and ADP, were identified and determined. Inosinic acid, a very important tasting

Table 1. Proximate analysis of the material.*

Moisture	Crude fat	Crude ash	Total-N (A)	Extractive-N (B)	α-Amino-N (C)	$\frac{B}{A} \times 100$	$\frac{C}{B} \times 100$
73.8	0.65	1.38	2.28	0.506	0.332	22.2	65.6

* Values are expressed as per cent on wet basis.

Table 2. Composition of various non-protein nitrogenous compounds in the abalone muscle*

Component	Amount	Nitrogen
Taurine	946	105.9
Aspartic acid	9	0.9
Threonine	82	9.6
Serine	95	12.6
Glutamic acid	109	10.4
Proline	83	10.1
Glycine	174	32.5
Alanine	98	15.4
Valine	37	4.4
Methionine	13	1.2
Isoleucine	18	1.9
Leucine	24	2.6
Tyrosine	57	4.4
Phenylalanine	26	2.2
Tryptophan	20	2.7
Histidine	23	6.2
Lysine	76	14.6
Arginine	299	96.2
AMP	90	18.2
ADP	12	2.0
TMA	1.1	0.3
TMO	3.2	0.6
Glycine betaine	975	116.6
NH_3	8	6.6
Total	3278.3	478.1

* Values are expressed as mg. in 100 g. of the fresh tissues.

substance of foodstuffs, was not detected. This may be due to the lack of AMP deaminase.[8]

The TMO content was very low (3.2 mg%), while Shimidu *et al.*[9] reported that the nitrogen of the base amounted to 61.4 mg% in their specimen, the value being almost 100 times as much as the present one. As they collected the sample at the end of August, the difference may be explainable by the seasonal variation. On this point, a further study seems to be necessary.

On the other hand, another trimethylammonium base, glycine betaine, was found to be present in a remarkably high level, amounting to about 1% of the fresh tissues, and the betaine-N corresponded to 23% of the total extractive-N. This indicates that the base is one of the main nitrogenous compounds in the muscle extracts of the

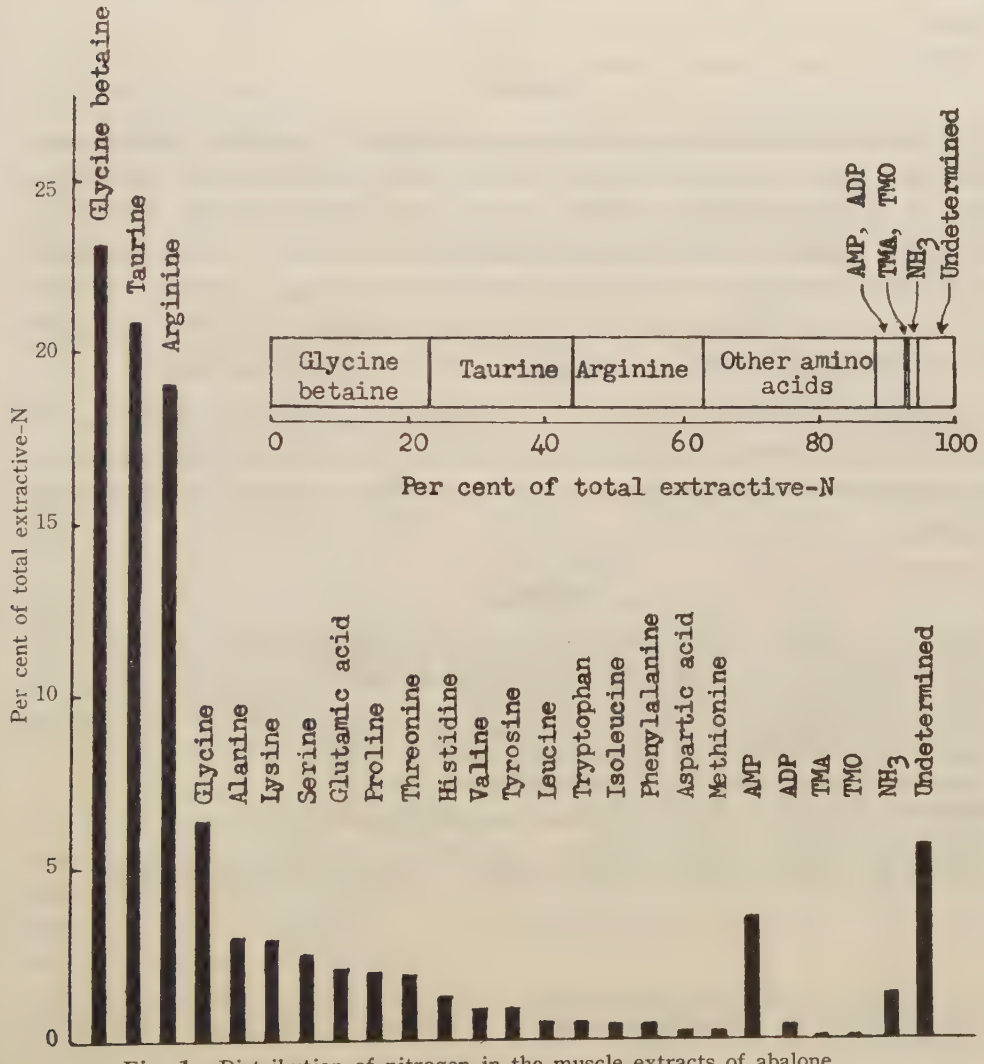


Fig. 1. Distribution of nitrogen in the muscle extracts of abalone.

abalone and it is most likely that the base contributes greately to the flavor of the meat.

Among the amino acids detected, taurine was the most abundant and amounted to almost 1% of the tissues. The content of arginine and glycine was also found to be comparatively high.

As shown in Fig. 1, 94.4% of the extractive-N has been accounted for as glycine betaine-N (23.0%), taurine-N (20.9%), arginine-N (19.0%), other amino acids-N (26.0%), AMP-N (3.6%), ADP-N (0.4%), TMA-N (0.1%), TMO-N (0.1%) and NH_3-N (1.3%). Thus the distribution of non-protein nitrogenous constituents in the abalone meat has almost completely come to light.

Undetermined-N (about 5% of the extractive-N) is considered to be derived from such minor components as betaines other than glycine betaine, choline, lower peptides* and others.

Summary

The distribution of various nitrogenous constituents in the muscle extracts of an abalone was investigated and about 95% of the extractive-N (506 mg%) has been accounted for as glycine betaine-N (23.0%), free amino acids-N (65.9%), AMP- and ADP-N (4.0%), TMA- and TMO-N (0.2%) and NH_3-N (1.3%). Glycine betaine was found to be one of the most important constituents in the muscle extracts. Among the free amino acids detected, taurine was the most abundant (946 mg%). The content of arginine (299 mg%) and glycine (174 mg%) was also comparatively high.

The authors are grateful to Prof. Y. Hashimoto for his valuable advice and Mr. E. Kasai for his technical assistance in the course of this work. The expenses of this investigation were defrayed partly by a research fund granted from the Ministry of Education.

References

1) Kōnosu, S., Akiyama, T. and Mori, T.: *This journal*, **23**, 561 (1958).
2) Kōnosu, S., Akiyama, T. and Mori, T.: *Ibid.*, **23**, 565 (1958).
3) Kōnosu, S. and Kasai, E.: *Ibid.*, **27**, 194 (1961).
4) Fujita, T., Hashimoto, Y. and Mori, T.: *Ibid.*, **25**, 147 (1959).
5) Moore, S. and Stein, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **192**, 663 (1951).
6) Yemm, E. W. and Cocking, E. C.: *Analyst*, **80**, 209 (1955).
7) Hashimoto, Y. and Okaichi, T.: *This journal*, **23**, 269 (1957).
8) Saito, T.: *Chemistry*, **15**, 101 (1960).
9) Shimidu, W., Hibiki, S., Sibata, S. and Takeda, D.: *This journal*, **19**, 871 (1953).

* The amount of NH_2-N showed an increase of 10 mg% after hydrolysis with 3 N HCl for 3 hours at 121°C.

かつお節のシラタに関する研究—Ⅲ.

シラタの肉質の組織学的検索

小 泉 千 秋

(1960 年 11 月 9 日受理)

STUDIES ON THE *SHIRATA* IN *KATSUOBUSHI*—III. HISTOLOGICAL STUDIES ON THE MUSCULAR TISSUE OF *SHIRATA*.

Chiaki Koizumi*

In the previous papers[1),2)], results of spectrophotometric studies on discoloration of *katsuobushi* have been reported.

On the present work, histological pattern of muscular tissue in *katsuobushi* was observed with a microscopic technique. While the muscle fibers in the normal portion of *katsuobushi* were found lying compactly aggregated in some places (Figs. 1 and 3) and mutually separated in other places (Fig. 2), muscle fibers in a part of *shirata* were always separated from one another, leaving large gaps between them (Fig. 4). In a pieces of *katsuobushi* made from a muscular tissue of a large fat content like *sanriku-bushi* (Fig. 2), a layer of fat was found distributed so as to fill up the interstices of muscle fibers keeping the fibers from close aggregation. According to the result of a test with Schiff's reagent, the fat in this condition is regarded to have been autoxidized. If the results of the previous reports are referred to, it may be said that the fat takes part in the turning ashy white of the fatty tissue with formation of *shirata* and makes, further, a cause of the moldering of a *katsuobushi*.

Apart from the concern of subcutaneous fat, skipjack specially suited to be manufactured into *katsuobushi* is generally rather poor in the content of body fat. The muscular tissue of such skipjack is scarcely spreaded with fat (Figs. 5 and 6). But in the case of finished *katsuobushi* it is general that fat exists as distributed throughout the muscular tissue (Figs. 1 and 2). To clarify the cause inducing this discrepancy, the histological change of muscular tissue that occurs in the manufacturing course for *katsuobushi* was persuaded by observing the permeation of subcutaneous fat into the muscular tissue (Figs. 7, 8 and 9). The results of this inquiry indicates that subcutaneous fat goes distributed between the muscle fibers in the processing stage of smoking (according to the routine procedure, *katsuobushi* is prepared by smoking a previously boiled flesh of skipjack and then drying the smoked flesh). The subcutaneous fat permeated into muscular tissue in the smoking process may thus be looked upon as a grave cause that induces the decolorization of *katsuobushi* to the state of *shirata*.

著者は前報[1),2)]でかつお節のシラタは節の色調が灰白色であるばかりでなく肉質が緻密性を失つて粗崩化していることを指摘し，色調の灰白色化の原因は節中の筋肉色素が消失するためであり，またこの筋肉色素の消失には節に含有されている脂肪が関与していることを報告した。脂肪含有量の多い節ほどシラタが多い事実から，節に含まれている脂肪は単にシラタの色調の灰白色化に関与するばかりでなく，なんらかの形で肉質の粗崩化にも影響しているものと考えられる。

一般にかつお節の製造には脂肪含有量の少ないかつおを選んで使用するので，この原料生かつおの組織切

* 東京水産大学 (Tokyo Univ. Fish., Minato-ku, Tokyo, Japan).

片を観察すると皮下組織には脂肪層が認められるが，内部の筋肉組織中にはほとんど脂肪の存在しないのが普通である (Fig. 5)。ところが製了した節の組織切片を調べてみると多くの場合かなり内部の組織中にも筋線維間に脂肪が分布しており，その程度は三陸節のように原料魚の脂肪含有量の多いもの程著しい (Fig. 2)。もちろん節の中には筋線維間に脂肪の認められないものもあり (Fig. 3)，それらは組織が緻密で美しいベッコウ色をしている。したがつて節がベッコウ色を呈していることと内部組織の筋線維間の脂肪の有無とは直接関係はないが，シラタでは必ず筋線維間に脂肪が分布しており，そのために筋線維間に広い間隙が存在するのが認められる (Fig. 4)。

上に述べたように生かつおでは内部組織の筋線維間には脂肪がほとんど存在しないにもかかわらず製了した節では筋線維間に脂肪が存在するという事実は製造学上重要な問題点であると思われる。著者はこの節の筋線維間に存在する脂肪の来源を組織学的に研究し，焙乾が進行するにつれて皮下脂肪が節の皮付側から中骨側に向つて筋間結合組織に沿つて次第に浸透していくことを認めた。すなわち皮下脂肪がかつお節のシラタ化に非常に大きな役割を演じていることが判明した。

実　　験

I) 組織切片の作製

a) かつお節の製造工程における節の組織切片の作製：1960年7月末に伊豆沖で獲れたかつおのうち比較的脂肪含有量の少ない 2.4 kg および 3.4 kg のものを3匹宛選んで，それぞれ6枚の亀節の原料とした。製造方法は伊豆地方で一般に行なわれている方法にしたがい，生，煮熟，1番火，3番火，5番火および8番火の各段階にわけて試料を作製した。組織切片の作製に供したかつおの部位は魚体の中心で最も側線に近い背側筋を用いた。生，煮熟，1番火および3番火における組織切片はホルマリンで固定後，ゼラチンに埋没[3]して厚さ 20μ の凍結切片とした。5番火，8番火における組織切片はそのままミクロトームで厚さ 10μ に薄切した。

b) 製了したかつお節の組織切片の作製：供試かつお節の小片をそのままかあるいは3～5分間水中に浸漬した後ミクロトームで厚さ 10μ に薄切した。

II) 組織切片中の中性脂肪，脂肪酸の染色およびカルボニル化合物の確認

組織切片中の中性脂肪，脂肪酸は acetic-carbol-sudan-III[4] および nilblue[5] で染色して確認し，カルボニル化合物は SCHIFF 氏試薬[6] で処理して確認した。

結果および考察

かつお節の組織切片を sudan-III で染色して観察すると脂肪含有量の多い節の場合には筋線維間に脂肪の粒子が認められ，特に三陸産の油節は脂肪の粒子も大きく，その量も非常に多いが (Fig. 2)，脂肪含有量の少ない極く良質の節には全くこのような脂肪の存在は認められない (Fig. 3)。また節の組織の筋線維間に広い間隙のあるものと (Fig. 2, 4)，各筋線維が比較的密着して狭くなつているものとが観察される (Fig. 1, 3)。これらの点を節のシラタ部分と普通部分とについて比較してみると，一般にシラタ部分は筋線維間の間隙が広く (Fig. 4)，普通部分のそれは比較的密着して狭いものが多い (Fig. 1, 3)。このように節によつて筋線維間の間隙の広さが異なるのはそこに存在する脂肪量に関係するものと考えられる。

かつお節の原料には一般に脂肪含有量の少ないかつおを用いるために，原料かつおの脂肪の分布を組織学的に調べてみても，皮下脂肪層は認められるがそれ以外の筋肉組織中には脂肪はほとんど分布していない。しかしながら製了した節の組織切片中には多くの場合筋線維間にかなり多量の脂肪が存在する。著者は製了した節の筋肉組織中に分布する脂肪は主として皮下脂肪が浸透して来たものであろうと推量した。すなわちかつお節の製造工程において，節の水分が最も著しく除かれる焙乾の際に水分が除去されると同時に逆に皮下脂肪が筋間結合組織に沿つて筋肉組織中に浸透するものと考えた。この点を確認するために，かつお節の製造工程のうち生，煮熟，1番火，3番火，5番火および8番火の各段階における皮下脂肪の動向を組織学

的に観察した。Fig. 5 は生かつおの皮下脂肪層およびその附近の筋肉組織を示したものであるが，皮下脂肪層附近の筋肉組織中には多少の脂肪が分布する程度で，それよりも更に内部の筋肉組織中には脂肪はほとんど認められない。煮熟かつおにおいてもこれと全く同じである。Fig. 6 は1番火におけるかつおの皮下脂肪層およびその附近の筋肉組織を示したものであるが，この場合もやはり生および煮熟における脂肪の分布と著しい差異は認められない。ところが3番火 (Fig. 7) になると，今度は皮下脂肪層はほとんど認められず，皮下脂肪層と筋肉組織との間にある結合組織を通して皮下脂肪はすべての筋間結合組織に沿つて筋肉組織中に浸透していることが観察され，その程度は皮付側から中骨側に向つて節の厚さの 1/5～1/4 まで浸透している。

Fig. 9 は丁度皮下脂肪が筋肉組織中に浸透して来たところを示す。Fig. 8 は8番火における皮下脂肪層およびその附近の筋肉組織を示すが，皮下脂肪層は全く認められずに，脂肪はその附近の筋肉組織の筋間結合組織に著しく多量に存在することが認められる。また各筋線維はすでに比較的よく接近していることも観察される。5番火における皮下脂肪層およびその附近の筋肉組織の状態は8番火における脂肪の分布状態と全く変らない。これらの結果から，製了した節の組織中に認められる脂肪は主として皮下脂肪に由来するものであることが判明した。しかしながら皮下脂肪のすべてが筋肉組織中に浸透していくわけではない。かつお節の製造工程において，焙乾の初期に，油が節の上皮を通して表面ににじみ出ているのが観察される。すなわち皮下脂肪は煮熟と骨抜きの際に一部は溶出し一部は機械的に除去され，焙乾の際にも一部分表面ににじみ出ると同時に筋間結合組織に沿つて筋肉組織中に浸透していくのである。かつお節のシラタが特に皮付側の表面に発生しやすく，中骨側に発生しにくいのは筋間結合組織に沿つて浸透した皮下脂肪の量が皮付側の表面に近いところ程多いためであり，このことは脂肪含有量の多い節程シラタになりやすい事実と一致している。また脂肪含有量の多い生かつおの組織切片を観察すると，筋節と筋節との境目の筋隔に沿つて局部的に大きな粒状脂肪を認めることがある。この筋隔に分布する脂肪は3番火ですでに筋間結合組織に沿つてその附近の筋肉組織中に拡がつているのが観察される (Fig. 10)。製了したかつお節を割つた時にしばしば節の内部の少部分だけが局部的にシラタになつているのを見受けることがあるが，この種のシラタは組織中に浸透して来た皮下脂肪に原因するのではなく，最初から筋隔に存在した脂肪に原因しているものと考えられる。

製了したかつお節の組織切片を nilblue および SCHIFF 氏試薬で処理して脂肪の性状を組織化学的に調べてみると，nilblue では遊離脂肪酸の存在を確認することはできなかつたが SCHIFF 氏試薬との反応では節のシラタ部分，普通部分を問わず脂肪が大きな粒状をなして分布する場合は陽性でカルボニル化合物の存在することを示した。このことは製了したかつお節に含有される脂肪が自働酸化し，その結果生成した過酸化物が分解してカルボニル化合物を生成したことを意味するものと考えられる。

以上の知見から，かつお節の肉質が粗崩化するのは焙乾以後の製造工程において，筋間結合組織に沿つて筋肉組織中に浸透していつた皮下脂肪が筋線維間に充塡された油の層として存在して，各筋線維の相互に密着することを妨げ，更にこの脂肪はたとえば油鞣のような形で筋間結合組織の蛋白質に作用して，これを崩壊してかつお節の肉質を粗崩化するのに重要な役割を演じているものと考えられるが，この点に関しては今後の研究にまたなければならない。また節の筋肉組織中に分布する脂肪はカルボニル反応を呈することから見て自働酸化していることは明らかであり，この自働酸化した油脂が節の筋肉色素の porphyrine 環の開裂に関与していることは前報の結果と合せて確実であり，かつお節の灰白色化の原因になつていることは明らかである。このような理由から三陸節のように脂肪含有量の非常に多い節は現在ベッコウ色をした普通品であつても貯蔵中にシラタ化するものと考えられる。

このようにかつお節のシラタ化には主として皮下脂肪が原因しているので，シラタの防止策を考える際に筋肉組織中に浸透してゆく皮下脂肪の自働酸化を化学的に抑制することも重要であろうが，皮下脂肪が最も多量に筋肉組織中に浸透していく焙乾の初期あるいはそれ以前に物理的な方法によつて皮下脂肪を除去して皮下脂肪の筋肉組織内への浸透をできるだけ阻止することに考慮を払うことが必要であろう。

要　　約

かつお節のシラタの肉質を組織学的に検討した結果節のベッコウ色をした普通部分の筋肉組織には筋線維間の間隙の広いものと狭いものとがあるが，シラタ部分のそれは必ず広いことを認めた。この筋線維間の間隙はそこに分布する脂肪量に関係しているものと考えられる。この筋線維間に存在する脂肪の来源について組織学的に検討し，主として皮下脂肪が節の製造工程中に浸透して来たものであることを明らかにした。また製了したかつお節の組織中に分布する脂肪はカルボニル反応を呈することから，自働酸化していることは明らかであり，前項の結果とあわせて，かつお節の色調の灰白色化にも肉質の粗崩化にも重要な役割を演じているものと考えられる。

終りに臨み懇篤なる指導と校閲を賜つた東京水産大学野中順三九博士に感謝する。また実験の材料を提供された株式会社かねにんべん専務高津照五郎氏ならびに西伊豆町の真野活自氏に感謝する。

文　　献

1) 小泉千秋・野中順三九：本誌，**26**，1210～1215 (1960).
2) 小泉千秋：本誌，**27**，166～170 (1961).
3) 緒方知三郎編：病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき，p 106～108 (1959).
4) David Glick: Techniques of Histo-and Cyto-chemistry, p 39～40 (1949).
5) 今泉正訳：組織化学および細胞化学理論と方法，p 324～328 (1959).
6) 今泉正訳：組織化学および細胞化学理論と方法，p 340～351 (1959).

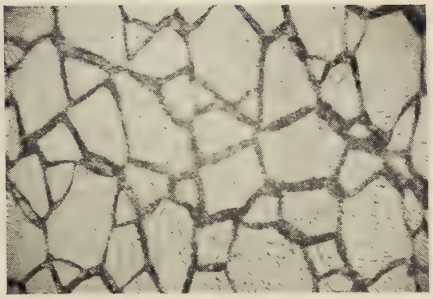


Fig. 1. Histological illustration of muscular tissue in normal portion of *katsuobushi*. Dyed with acetic-carbol-sudan-III.

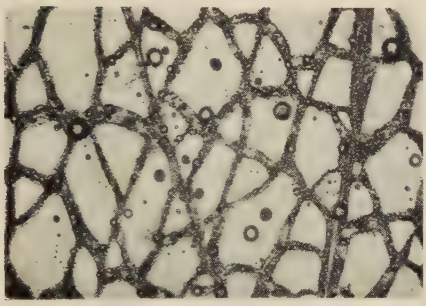


Fig. 2. Histological illustration of muscular tissue in normal portion of *katsuobushi* (*sanriku-bushi* with a large quantity of fat). Dyed with acetic-carbol-sudan-III.

Fig. 3. Histological illustration of muscular tissue in normal portion of *katsuobushi* (a well manufactured product with little fat). Dyed with acetic-carbol-sudan-III.

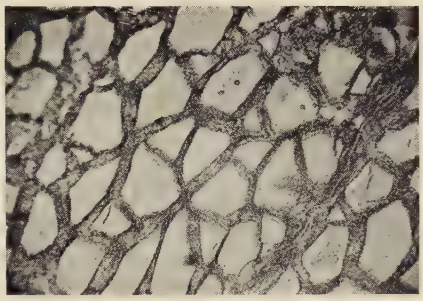


Fig. 4. Histological illustration of muscular tissue in *shirata* portion. Dyed with acetic-carbol-sudan-III.

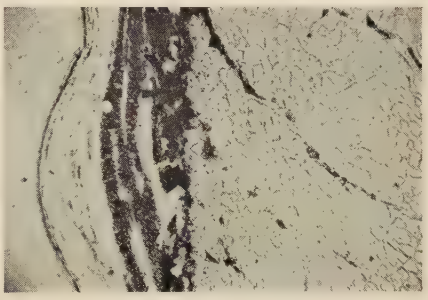


Fig. 5. Showing the subcutaneous fat in muscular tissue of raw skipjack-flesh. Dyed with acetic-carbol-sudan-III.

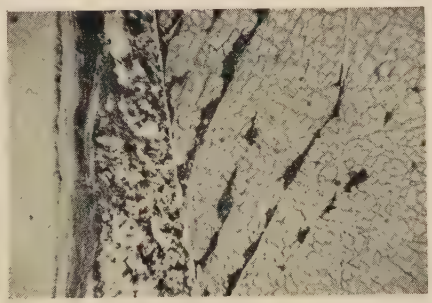


Fig. 6. Showing the subcutaneous fat in muscular tissue of skipjack-flesh subjected to the 1st smoking. Dyed with acetic-carbol-sudan-III.

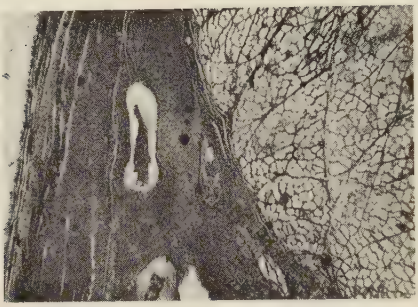


Fig. 7. Showing the subcutaneous fat in muscular tissue of skipjack-flesh subjected to the 3rd smoking. Dyed with acetic-carbol-sudan-III.

Fig. 9. Histological illustration of a muscular tissue of skipjack-flesh subjected to the 3rd smoking and permeated with subcutaneous fat. Dyed with acetic-carbol-sudan-III.

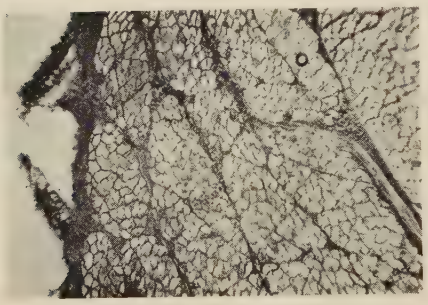


Fig. 8. Showing the subcutaneous fat in muscular tissue of skipjack-flesh subjected to the eighth smoking. Dyed with acetic-carbol-sudan-III.

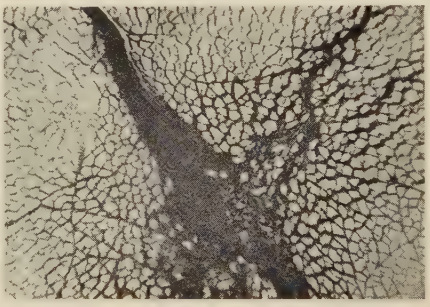


Fig. 10. Showing the spreading out of the fat originally existing between the myotomes in to the neighboring tissue subjected to the 3rd smoking. Dyed with acetic-carbol-sudan-III.

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—XI.

ビタミンA濃縮物のエステル化 (其の3)
フタル酸類のジビタミンAエステル

衣 巻 豊 輔

(1960 年 11 月 24 日受理)

STUDIES ON THE ECONOMICAL MANUFACTURE OF VITAMIN A CONCENTRATE FROM FISH LIVER OIL—XI.
ESTERIFICATION OF VITAMIN A CONCENTRATE
3. DIVITAMIN A ESTERS OF PHTHALIC ACIDS

Toyosuke Kinumaki*

The work described in this paper was undertaken to find out whether esters of phthalic acids are suitable for economical preparation of crystalline vitamin A ester from concentrate.

Phthalic acids used in the experiments included ordinary phthalic, terephthalic and isophthalic.

i) Preparation of esters

Each of the phthalic acids was converted to acid dichloride and then made to react with vitamin A concentrate respectively as in the previous paper (Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **20**, 1027, 1955).

Recovery of vitamin A in the esterification was not constant in each test and generally was low (shown in Table 1). The low recovery can be attributed to the presence of acidic monoesters which are produced by the use of excess acid dichlorides. The monoesters cause the loss of vitamin A into water and promote emulsification in the alkali washing procedure.

ii) Fractionation of esters

The esters thus obtained could not be crystallized. Poor results were also obtained in the fractionation of these esters by solvent distribution, molecular distillation and chromatographical adsorption. See Tables 2 and 3.

The poor results may be explained as follows. Diesters prepared from a dibasic acid and various alcohols are the mixture of many diesters each having two bindings either of different alcohols or of identical alcohols. Obviously it is difficult to isolate an individual diester from this complicated mixture of diesters similar to each other in properties.

In the case of ordinary phthalate, a fraction showing the presence of anhydrovitamin A was obtained. This means that a part of vitamin A is changed into anhydrovitamin A in esterification or subsequent treatments.

iii) Preparation and crystallization of synthetic vitamin A terephthalate

In order to confirm the supposition that the difficulties in isolation of an ester was due to the presence of other alcohols in the concentrate, synthetic pure vitamin A was made to react with terephthalyl dichloride. In this case, the ester prepared was easily crystallizable. This ester (m.p. 55～56°C, vitamin A potency: 2560,000 I.U. per gr.) was divitamin A terephthalate (Figs. 1 and 2).

* 東海区水産研究所 (Tōkai Reg. Fish. Res. Lab., Chuō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 339 号

緒　　言

ビタミンA（以下単にAと記す）を結晶とするには，エステル，エーテル，ウレタン等の誘導体とする方法があるが，この内エーテルはAアルコールから直接合成することが困難であるし，ウレタンは鹸化により遊離のAアルコールを回収する点に難点を有している。したがつてA濃縮物を結晶化して利用する目的にはエステルが適している。

ところで，現在までに知られているAのエステルは11種である[1),2)]が，この中でA濃縮物よりAエステルの結晶を得るために応用されているのはアセテイト，β-アントラキノン・カルボキシレイト，p-フェニルアゾベンゾエイトなど数種に過ぎない。しかも，これらのエステルは結晶を生成させるためにA濃縮物をあらかじめ非常に純化する必要があつたり，Aの損失なくエステルを作るためには操作が繁雑となつたり，エステル化に要する試薬が高価である等の欠点を有している。

したがつて，Aエステルの結晶を経済的に製造するには，A濃縮物をそれ程純化しないでも結晶が得られ，しかもエステル化試薬が安価であるような新しいエステルを見出すことが望まれている。

著者は最近工業的に多量に製造されるようになつたフタル酸類（フタル酸，テレフタル酸およびイソフタル酸。以下それぞれ **P 酸**，**TP 酸**，**IP 酸**と略す。）がAの結晶性エステルを製造する目的に適したものと考え以下の実験を行なつた結果をここに報告する。

実　験　の　部

1) 装　置

第 VI 報[3)]の装置と同様である。

2) 試　薬

使用した試薬は酸クロリドを除いては第 VI 報と同様である。酸クロリドはつぎに示すようなものを使用した。なお今後の実験において酸クロリドの合成に使用した **TP 酸**，**IP 酸**はすべて川崎化成工業株式会社により提供されたものである。

P 酸ジクロリド。　市販最純対称型フタル酸ジクロリドをそのまま使用した。

TP 酸ジクロリド。　**TP 酸**に過剰の五塩化燐，触媒として少量の無水塩化亜鉛および溶剤としてオキシ塩化燐を加え，加熱反応させ，得られた粗クロリドを石油ベンジンで再結した融点 83～84°C の結晶。

IP 酸ジクロリド。　**IP 酸**より **TP 酸**の場合と同様に合成，精製を行なつた融点 43～44°C の結晶。

3) 実験方法ならびに結果

a. エステルの製造

酸ジクロリドを，A濃縮物を全部Aと仮定した理論量の 1.1～1.2 倍，ピリジンを酸クロリドに対する理論量の2倍使用し，第 VI 報[3)]と同様にベンゼン中で反応させた。酸ジクロリドを加え終つてから 40～50°C に約1時間放置し，反応生成物は第 VI 報と同様に酸，アルカリ，水の洗滌操作を行なつた。このようにして得られたA濃縮物のジエステルの性状および収量を Table 1 に示す。これより明らかなようにA回収率は一般に不良でかつ一定しなかつた。また吸光比がエステル化後かなり増加する場合もある。これはエステル化およびその後の処理においてAが一部変化していることを示している。

A 回収率が悪いのは洗滌に際してエマルジョンを形成しやすく，一部の A が損失するためであるが，操作中 A がアンヒドロ A になつたり（次項参照），酸化したりすることによる損失も考えられる。

b. エステルの分別濃縮

溶剤による分別。　前項において得たA濃縮物とフタル酸類とのエステルは非常に粘稠な油状物ないしは樹脂状物であつて，石油エーテル，ベンゼン，シクロヘキサン，アセトン，蟻酸エチル等には可溶であるがメタノール，エタノール，イソプロパノール等にはほとんど溶けない。これらの溶剤を単独または混合したものにエステルを溶かし，冷却したが油状物が分離するだけで結晶は得られなかつた。そこで油状物をとりAの濃縮状況をみたが，Table 2 に示すように良好な成績は得られていない。

Table 1. A 濃縮物の P 酸, TP 酸および IP 酸エステルの製造
Preparation of phthalate, terephthalate and isophthalate of vitamin A concentrate.

試験番号 Test No.	エステルの種類 Kind of ester	A 濃縮物試料 Original vitamin A concentrate: 重量 Weight g	A単位* Vitamin A potency 10^4 I.U./g	吸光比 E value ratio 300mμ/325mμ	生成したエステル Ester produced: 重量 Weight g	A単位** Vitamin A potency 10^4 I.U./g	吸光比 E value ratio 300mμ/325mμ	Aの回収率 Vitamin A recovery %
1	P酸エステル phthalate	1.88	193.2	0.66	2.70	104.6	0.62	78
2		1.74	176	0.64	1.91	154.5	0.67	97
3		2.32	192	0.65	3.09	121.5	0.69	84
4		2.39	176	0.66	3.25	118	0.69	91
5	TP酸エステル Terephthalate	21.2	13.1	0.64	24.5	10.5	—	93
6		9.90	222	0.64	9.80	156.5	0.65	70
7		2.61	189	0.66	2.30	111	0.73	52
8		2.21	189	0.67	2.35	131	0.62	74
9		9.40	75.9	—	12.40	55.6	—	97
10		8.0	77.9	—	9.70	59.3	—	92
11	IP酸エステル Isophthalate	2.21	190	0.68	2.95	151	0.67	105
12		2.54	161	0.62	2.62	123.5	0.63	78
13		2.07	167	0.68	2.96	103	0.65	88
14		6.32	179	0.59	7.94	120.5	0.63	85

* For Tables 1 to 8 vitamin A potency was calculated by $E^{1\%}_{1cm}$ 325 mμ×1900 for the concentrate (vitamin A alcohol) and $E^{1\%}_{1cm}$ 328 mμ×1900 for the ester.

Table 2. A 濃縮物の P 酸, TP 酸, IP 酸エステルの溶済分別
Solvent fractionation of phthalate, terephthalate and isophthalate of vitamin A concentrate.

エステル試料 Ester used: 種類* Kind	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I. U./g	方法** Method of fractionation	不溶部 Insoluble fraction: 重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I. U./g	A回収率 V. A. recovery %	溶解部 Soluble fraction: 重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I. U./g	A回収率 V. A. recovery %	備考 Remarks
No. 1	2.0	104.6	A	0.5	96.3	23	1.5	65.6	47	溶解部はアンヒドロ A の吸収を示す。
No. 3	3.1	121.5	B	1.7	105.5	48	1.4	77.4	29	Sol. frac. showed absorption max. of anhydro V. A.
No. 4	3.0	118	C	1.3	155	57	1.6	98	44	
No. 11	2.5	151	D	0.4	126	13	2.1	153	85	—
No. 6	8.8	156.5	E	5.3	167	64	3.5	140	36	溶解部の極大 313mμ
No. 9	9.8	55.6	F	8.8	57.9	93	1.0	40.6	7.5	Sol. frac. showed max. at 313mμ
No. 10	9.2	59.3	G	6.8	55	65	2.4	79.6	33	—

* 第1表の試験番号を示す。 Represents ester specified under test number in Table 1.

** 方法はつぎのごとくである。Methods used are as follows.

A: 等量のアセトンに溶解 15 倍量のメタノールを加え冷却 (−20°C). Dissol. ester in equal vol. of acetone, then add 15 vols. of methanol and cool the mixture at −20°C.

B: 等量のアセトンに溶解 10 倍量のメタノールを加え冷却 (−20°C). Dissol. ester in equal vol. of acetone, then add 10 vols. of methanol and cool the mixture at −20°C.

C: アセトン, メタノール混液 (1 : 2) 10 倍量に溶解後冷却。Dissol. ester in 10 vols. of acetone-methanol mixture (1 : 2) and cool it at −20°C.

D: 5 倍量のアセトンに溶解冷却 Dissol. in 5 vols. of acetone and then cool it at −20°C.

E: 5 倍量の蟻酸エテルに溶解冷却 Dissol. in 5 vols. of ethyl formate and then cool it at −20°C.

F: 10 倍量の石油エーテルに溶解, 各 5 倍量のメタノールで 5 回抽出する。Dissol ester in 10 vols. of petr. ether and then extract 5 times each with 5 vols. of methanol.

G: 各 2.5 倍量のメタノールで 5 回抽出 Extract ester 5 times each with 2.5 vols. of methanol.

なお，この表をみると **P 酸**エステルは **TP 酸**および **IP 酸**エステルと異り，アンヒドロ A の吸収を示す劃分を有している。したがつて **P 酸**エステルの場合は一部の A がエステル化または溶剤分別に際してアンヒドロ A に変化するものと考えられる。

分子蒸留による分別。 Table 1 の実験において得た No. 13 のエステルを Pot Still にいれ分子蒸留した。その結果 250°C までの温度では，ほとんど留分が得られず，それ以上の温度で蒸留した留分はアンヒドロ A の吸収を示し，残渣は一般吸収を示す固い樹脂状物となつた。

つぎに No. 5 のエステルをサラダ油に溶かし薄膜流下式蒸留器で蒸留した。この場合は 115°C で重量で約 15% の留分が得られたが，留分の A 単位はもとのエステルの単位と変らず，しかも残渣の A 単位は約 1/10 に低下した。さらに温度を高めても，もはや留出する部分はなく，残渣は一般吸収を示すようになつた。

この結果 A 濃縮物のフタル酸類ジエステルは高度真空下においても加熱により分解重合を起すため蒸留による濃縮は不可能と思われる。

クロマト吸着による分別。 常法に従い活性アルミナを吸着剤としてクロマト分別を行ない，Table 3 に示す結果を得た。A はやや濃縮されるが，A 歩留りが悪く，良好な分別成績は得られなかつた。

Table 3. A 濃縮物の TP 酸および IP 酸エステルのクロマト分別
Chromatographical fractionation of terephthalate and isophthalate of vitamin A concentrate.

エステル試料 Ester used			石油エーテル部 Petroleum ether farc. eluted			ベンゼン部 Benzene frac. eluted		
種類* Kind	重量 Weight g	A 単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	重量 Weight g	A 単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A回収率 V. A. recovery %	重量 Weight g	A 単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A回収率 V. A. recovery %
No. 8	2.3	131	1.4	173	80.5	0.4	44	5.8
No. 14	7.9	120.5	5.1	137	73.5	0.3	11.8	3.7

* 第 1 表の試験番号を示す。 Represents ester specified under test number in Table 1.

c. 合成 A の TP 酸エステルの製造ならびに結晶化

前記のように A 濃縮物よりはエステルの結晶が得られなかつたので合成 A を試料として実験した。

合成 A アセテイトの結晶を鹸化して得たアルコール（A単位: 330 万，吸光比: 0.57）1.79g を前記の条件で **TP 酸**ヂクロリドと反応させエステル（A 単位: 229.5 万，吸光比: 0.57）2.20g を得た。A回収率は 92% である。このエステルを蟻酸エチルに溶解し冷却（−20°C）すると容易に結晶が析出した。粗結晶は 0.71g で A 単位: 218 万，吸光比: 0.52 であつた。これを蟻酸エチルで再結すると，菊花状に析出する結晶 0.54g（A 単位: 229.5 万，吸光比: 0.51）が得られた。これをなお再結を操り返しても A 単位は上昇しないので，最初に析出する部分を除き，あとから析出する結晶のみをとり再結したところ Fig. 1 に示すような淡黄色，融点 55〜56°C の結晶を得た。A単位は 256 万で Divitamin A terephthalate として計算した値の 96% とな

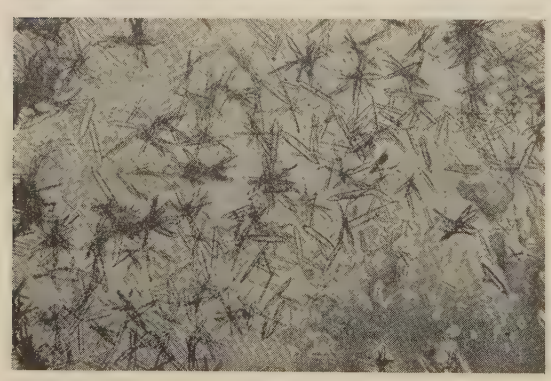


Fig. 1. A の P 酸エステルの結晶（蟻酸エテルより再結）
Crystalline divitamin A terephthalate (Recrystallized from ethyl formate).

る。紫外部吸収曲線は Fig. 2 に示すとおりでAおよびTP酸にもとずく吸収が明かにみとめられる。

考　　察

実験の部に示したように，フタル酸類をジクロリドとしてA濃縮物と反応させた場合，一般にエステル化における A の回収率が悪く，かつ一定しなかつた。また生成したエステルの純化も困難であつて，A 濃縮物を原料とした場合，A エステルの結晶は得られなかつた。

その理由として，A 濃縮物の純化が不充分であるとか，A のフタル酸類エステルの結晶性が予想よりも悪いためとも考えられるが，著者は二塩基性酸であるフタル酸類をヂクロリドとしてA濃縮物と反応させることと自体に原因するものと考える。

すなわちフタル酸類のような二塩基性酸のヂクロリドとアルコールとの反応ではつぎの図の（I）に示したようにジエステルが生成する。

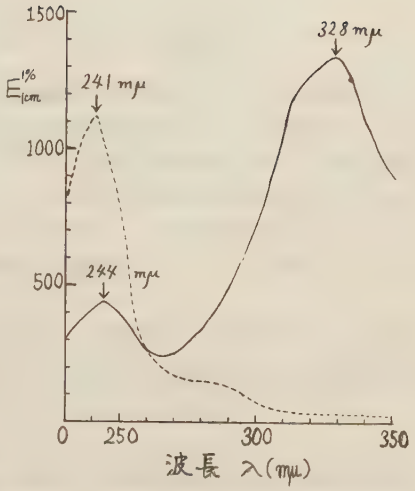
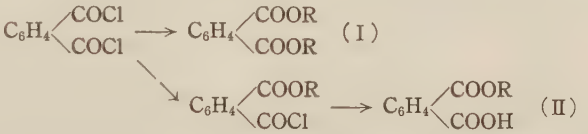


Fig. 2. A の TP 酸エステル結晶（シクロヘキサン溶液 ——）および P 酸（イソプロパノール ····）溶液の紫外部吸収曲線

Ultra violet absorption curves of crystalline divitamin A terephthalate in cyclohexane ——, and terephthalic acid in isopropanol ···· .



しかし，図の（II）に示したごとく酸性モノエステルを生ずることも考えられ，酸クロリドがアルコールに対し過剰である時には，特にその生成の可能性が強い。

エステル化を完全に行なうためにはやや過剰の酸ヂクロリドを使用する必要があるので，少量の酸性モノエステルができ，これがアルカリ洗滌に際してエステル塩となり，洗液中に損失し，あるいはエマルジョンの形成を助長し，A回収率の低下をまねくものと考えられる。

また一般に酸ヂクロリドとアルコールとの反応において，反応にあずかるアルコールが1種類の時は生ずるジエステルもただ1種であるが，2種以上の時は3種以上のジエステルが生成し，アルコールの種類が多いほど，多数の組合せが考えられる。一方，A 濃縮物は A 以外に各種の高級アルコール類を含有しているから，フタル酸類のジクロリドとの反応によつて生じた A エステルは，2つの酸基がともにと A 結合しているもののほかに，一方だけがAと結合し，他の一方が別種の高級アルコールと結合しているエステルも各種生成する可能性がある。このようにして出来たエステルの性質は互に類似していると考えられるから，それらの混合物より各エステルを単離することは非常に困難となるのであろう。したがつて，反応にあずかるアルコールがAしかなければ結晶化ははるかに容易になるはずで，これは本実験の結果にみるように合成A の TP 酸エステルがたやすく結晶することにより確められた。

以上の考えよりすれば，もしフタル酸の一方の酸基のみを適当なアルコールであらかじめエステル化した後，モノクロリドとしてA濃縮物と反応させれば，ヂクロリドの場合と異り，酸性モノエステルは生成しないし，生じたエステルの種類もヂエステルの場合よりも少なくなるから結晶化は容易となるはずであるが，この検討は次報にゆずる。

摘　　要

A フタル酸類ジクロリドによる A 濃縮物エステルの製造実験を行ないつぎの結果を得た。

1) エステル化における A 回収率は一般に不良で，かつ一定した値が得られなかつた。
2) 得られたエステルは結晶化し得ないばかりではなく，溶剤分別，分子蒸留，クロマト吸着等によつても良好な分別成績は得られなかつた。
3) オルトフタル酸の場合には，エステル化または分別に際して A がアンヒドロ A に変化した。
4) 合成 A を試料としテレフタル酸エステルの結晶を得た。

本研究に当り，御指導下さつた東博士，試薬を提供された川崎化成工業株式会社・青山氏，ならびに顕微鏡写真作製に御助力下さつた竹村技官にあつく感謝いたします。

文　　献

1) H. VOGEL u. H. KNOBLOCH: "Chemie und Technik der Vitamin", dritte Auflage, Erster Band, Ferdinand Enkeverlag, Stuttgart (1950), pp. 93.
2) 佐橋佳一（代表編集委員）："ビタミン学"，金原出版，東京，(1956), pp. 115～116.
3) 衣巻豊輔：日水誌，**20**, 1027～1034 (1955).

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—XII.

ビタミンA濃縮物のエステル化 (其の4)
フタル酸類のモノビタミンAエステル

衣 巻 豊 輔

(1960 年 11 月 24 日受理)

STUDIES ON THE ECONOMICAL MANUFACTURE OF VITAMIN A CONCENTRATE FROM FISH LIVER OIL—XII.

ESTERIFICATION OF VITAMIN A CONCENTRATE
4. MONOVITAMIN A ESTERS OF PHTHALIC ACIDS

Toyosuke KINUMAKI*

In the previous paper (Series XI), the author showed that the esterification of vitamin A concentrate with phthalyl dichloride have disadvantage due to the formation of acidic monoesters and many kinds of diesters resembling each other in properties.

In the present experiments, monomethyl ester phthalyl monochlorides were used as reagents for the purpose of preventing the disadvantage.

i) Preparation of esters

The method of esterification was the same as in the case of phthalyl dichlorides. After the esterification, petroleum ether insoluble impurities were removed from the crude esters obtained. A good recovery of vitamin A was obtained in the purified esters except the case of using monomethyl ester (orth-) phthalyl monochloride (Tables 1 and 2). A small amount of anhydrovitamin A was also formed when using monomethyl ester phthalyl monochloride. Formation of anhydrovitamin A is due to the acidity of phthalic acid stronger than that of tere- or isophthalic acid (Table 7).

ii) Crystallization of esters

Monomethyl phthalate could not be crystallized, but both monomethyl terephthalate and monomethyl isophthalate were crystallizable. The yield of crystalline monomethyl terephthalate was higher than that of acetate from high potency vitamin A concentrate. But monomethyl terephthalate from vitamin A concentrate of lower potency could not be crystallized (Tables 3, 4 and 5).

However, the yield of crystalline monomethyl isophthalate was high even when vitamin A concentrate of lower potency was used. In crystallizability, this ester was superior to the other kinds of vitamin A esters previously prepared and was comparable with vitamin A urethanes (Table 6).

緒 言

前報においては A 濃縮物とフタル酸類のジクロリドとの反応によりエステルを製造する実験を行ない A 濃縮物より結晶性 A エステルを得るためには，フタル酸をモノクロリドとして A と反応させた方が良好な結果が得られる見込を得たので，今回はその方法について実験した結果を報告する。

* 東海区水産研究所 (Tōkai Reg. Fish. Res. Lab., Chuō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 340 号

実 験 の 部

1) 装 置

ジエステルの場合と同じである。

2) 試 薬

フタル酸，テレフタル酸，イソフタル酸（**P 酸**，**TP 酸**，**IP 酸**と略す）よりつぎのように合成したモノメチルエステルP酸（**MP 酸**と略す），モノメチルエステル TP 酸（**MTP 酸**と略す），およびモノメチルエステル IP 酸（**MIP 酸**と略す）をモノクロリドとし使用した。その他の試薬は前と同様である。

MP 酸モノクロリド。 市販の無水フタル酸を純メタノールと反応させて製した **MP 酸**をベンゼンで再結晶後，過剰のチオニルクロリドとともに煮沸した後，減圧にてチオニルクロリドを完全に除去したものをそのまま使用した*。

MTP 酸モノクロリド。 **TP 酸**を 10% の H_2SO_4 を含むメタノールとともに煮沸してジメチルエステルとし，これを鹸化所要量の半量に相当する KOH を含むメタノールで部分鹸化後酸性とし **MTP 酸**を得た**。この **MTP 酸**をチオニルクロリドによりモノクロリドとし，石油ベンヂンで再結した結晶***を使用した。

MIP 酸モノクロリド。 **IP 酸**より **TP 酸**と同様に合成した **MIP 酸**をモノクロリドとし，石油ベンヂンに溶解後冷却し，結晶を析出させ，傾写にて 2～3 回精製したものを使用した****。

3) 実験方法ならびに結果

a. エステルの製造

上記のモノクロリドを A 濃縮物に対して 1.3 倍，ピリヂンをクロリドに対し 2 倍*****使用し，ヂエステ

Table 1. 同一の A 濃縮物の MP 酸，MTP 酸および MIP 酸エステルの製造比較試験
Comparative preparation of monomethyl-phthalate, -terephthalate and -isophthalate of the same vitamin A concentrate obtained from whale liver oil.

エステルの種類 Kind of ester	出発物 Starting material		粗エステル Crude ester obtained			精製エステル Purified ester			不純物 Impurity removed from crude ester		
	重量 Weight	A 単位 V.A. potency 10^4 I.U./g	重量 Weight	A 単位 V.A. potency 10^4 I.U./g	A 回収率 V.A. recovery	重量 Weight	A 単位 V.A. potency 10^4 I.U./g	A 回収率 V.A. recovery	重量 Weight	A 単位 V.A. potency 10^4 I.U./g	A 回収率 V.A. recovery
	g		g		%	g		%	g		%
MP 酸エステル Monomethyl-phthalate	3.8	207	6.9	122	105	5.4	127	87	1.3	16.7**	2.8
MTP 酸エステル Monomethyl-terephthalate	3.4	204	5.8	136*	114*	4.9	146.5	104	0.9	4.7***	0.6
MIP 酸エステル Monomethyl-isophthalate	2.9	204	5.1	110*	95*	4.3	133	97	0.8	20.7****	2.8

* 固体の不純物が混入しているため，必ずしも全体を代表する値ではない。
The values may not be necessarily correct because of contamination of solid impurity.
** アンヒドロAの吸収を示す。 Absorption curve showed the presence of anhydrovitamin A.
*** 一般吸収 General absorption.
**** Aの吸収を示す。 Absorption curve showed the presence of vitamin A.

* MP 酸の収率およびモノクロリドの収量はほとんど理論量である。MP 酸の融点 81～82°C（文献値 82.5°C）。クロリドは常温で液状である。
** 少量存在する未反応の MTP 酸ヂメチルエステルは MTP 酸の K 塩の水溶液から沪別して除く。また副成する TP 酸ジ塩より再生する TP 酸は再結により分別する。
*** ジエステルの再結後収量 93%，融点 138～140°C（文献値 141～142°C），MTP 酸の再結後収量約 60%，融点 216°C（文献値約 230°C），クロリドの融点 55～56°C.
**** ヂエステルの再結後収量 96%，融点 63°C（文献値 64～65°C），MIP 酸の再結後収量約 50%，融点 189°C（文献値 193°C），クロリドは 25°C の室温で液状である。
***** 倍数の計算はジエステルの場合と同様である。

ルの場合と同様に反応させA濃縮物のモノエステルを得た。

MP 酸, **MTP 酸**, **MIP 酸**の三者の比較試験を，鯨肝油より得たA濃縮物を用いて行なつた。その結果は Table 1 に示す通りであつた。表に見るように最初に得られた粗エステルは試薬に由来する不純物を含んでいるため，まずこれを除去した。この不純物については精査しなかつたが，95% 以上可鹸化物であるので試薬から来たものと考えられる*。不純物は **MP 酸**では油状，**MTP 酸**および **MIM 酸**では白色粉末であるが，いずれも石油エーテルに溶けにくいので粗エステルを石油エーテルに加熱溶解後冷却（**MP酸**，**MTP 酸**の場合は 5°C 程度，**MIP 酸**では常温）し，不溶のまたは冷却にて析出する不純物を分離する**。なお，**MP 酸**の場合は，不純物がアンヒドロAの吸収を示すところより，ジエステルの場合と同様，**P 酸**誘導体によるエステル化ではAの一部が脱水されアンヒドロAに変ることが判る。

Table 2. 種々の原料より得たA濃縮物の MTP 酸および MIP 酸エステルの製造
Preparation of monomethyl-terephthalate and -isophthalate of vitamin A concentrate obtained from various materials.

試験番号 Test No.	エステルの種類 Kind of ester	原料の種類 Kind of material	A濃縮物試料 Original vitamin A concentrate 重量 Weight	A単位 V.A. potency 10^4 I.U./g	吸光比 E value ratio 300mμ/325mμ	得られたエステル Ester obtained 重量 Weight	A単位 V.A. potency 10^4 I.U./g	吸光比 E value ratio 300mμ/328mμ	Aの回収率 V. A. recovery
			g			g			%
15		カジキ肝油 Marlin liver oil	5.8	194	0.65	10.8*	99	0.63	95
16		〃	17.9	189.5	—	24.5	122.5	—	93
17		〃	17.0	199	0.61	24.1	139	0.67	99
18		カジキ蒸溜アセテイト D. A. of marlin	3.6	217	—	5.5	144	—	101
19	MTP 酸エステル	大ザメ肝油 Shalk liver oil	7.5	258	0.59	10.8	172	0.59	96
20	Monomethyl-terephthalate	クジラ肝油 Whale liver oil	22.1	171	0.72	32.8	108.5	0.73	94
21		メヌケ肝油 Roch fish liver oil	13.3	259	0.60	18.9	179	0.62	99
22		カジキアセテイト残渣 A. R. of marlin	13.5	220	0.65	19.7	143	0.64	95
23		大ザメアセテイト残渣 A. R. of shark	18.9	228	0.65	26.6	164	—	100
24		メヌケアセテイト残渣 A. R. of rock fish	14.2	220	0.59	20.0	149	0.59	96
25	MIP 酸エステル	スケソウ肝油 Pollack liver oil	10.0	174	0.63	14.3	117	—	96
26	Monomethyl-isophthalate	カジキ肝油 Marlin liver oil	7.6	174	0.73	11.2	114	0.74	97

D.A.: the distilled acetate obtained from vitamin A concentrate of liver oil.
A.R.: the residue obtained after removing crystals of vitamin A acetate as in Table 5.
* 不純物を除去しない。 includes inpurities.

不純物除去後のA回収率は **MP 酸**の場合を除き，良好でエステル化反応ではほとんどAの損失がない。そこでいろいろな原料より得たA濃縮物より **MTP 酸**および **MIP 酸**エステルを製造し，A回収率をみた。Table 2 にその結果を示す。ただしこの場合のA回収率は不純物除去後のエステルについて計算した。この

* パルミテイトの製造の際に得られる不純物はパルミチン酸無水物であることを報告したが[8]，この場合もおそらく同様なものと想像される。
** この場合アセトン，蟻酸エチルを用いると，不純物が一部溶解する上，析出した不純物中にAが含有される傾向が大である。

表より明らかなようにモノエステルの場合は，ジエステルの場合と異り，Aの損失は少なく，大体一定した回収率が得られた。吸光比をみてもモノエステルの場合は，Aがエステル化に際して変化する傾向はなかつた。

b. モノエステルの結晶化

方法。 前項において得たA濃縮物のモノエステルの結晶化を試みた。結晶化の方法はモノエステルを2倍容量の石油エーテル (b. p. 40~60°C) に溶解し 20~30°C に冷却し，析出する粗結晶を傾瀉にて分離し，さらに蟻酸エチルで 1~3 回再結する方法が最もよかつたのでそれにしたがつた。

フタル酸の種類による結晶性の比較。 Table 3 に鯨肝油より得たA濃縮物の **MP 酸**, **MTP 酸**および **MIP 酸**エステルの結晶性の比較を行なつた結果を示す。結晶するAの歩留は **MIP 酸**エステルが **MTP 酸**エステルにまさり，**MP 酸**エステルは上記の条件では結晶しなかつた。

Table 3. 同一のA濃縮物の MP 酸，MTP 酸および MIP 酸エステルの結晶性の比較
Comparative crystallization of the purified esters obtained from the same vitamin A concentrate as in Table 4.

			エステルの種類 Kind of ester		
			MP 酸エステル Monomethyl-phthalate	MTP酸エステル Monomethyl-terephthalate	MIP 酸エステル Monomethyl-isophthalate
出発 Starting material		重量 Weight g	5.4	4.9	4.3
		A単位 V.A. potency 10^4I.U./g	127	146.5	133
石油エーテル溶液より結晶析出 Crystallization from petroleum ether	粗結晶 Crude crystals	重量 Weight g	析出せず	1.3	2.6
		A単位 V.A. potency 10^4I.U./g	Noncrystallizable	157	141
		A歩留 V.A. yield %		28	64
	非結晶部 Noncrystallizable portion	重量 Weight g	〃	3.6	1.7
		A単位 V.A. potency 10^4I.U./g		141	101
		A歩留 V.A. yield %		71	30
蟻酸エチルにて再結晶 Recrystallization from ethyl formate	精製結晶 Purified crystals	重量 Weight g	〃	0.6	1.2
		A単位 V.A. potency 10^4I.U./g		174.5	193
		A歩留 V.A. yield %		14.5	40.5
	非結晶部 Noncrystallizable portion	重量 Weight g	〃	0.7	1.4
		A単位 V.A. potency 10^4I.U./g		148	105
		A歩留 V.A. yield %		14.5	25.5

原料の差異による MTP 酸および MIP 酸エステルの結晶歩留ならびにアセテイトとの比較。 つぎに色々な原料より得た **MTP 酸**および **MIP 酸**エステルの結晶の歩留をみるため，前項 Table 2 に載せたエステルの総てについて結晶化を試みた。

Table 4 にはその内結晶の得られたものだけについての結果を示した。また Table 5 には比較のため同一の原料より別途に得たA濃縮物アセテイトの結果を示す*。

この二表の結果を比較すると，メヌケ肝油を原料としたA濃度の高いA濃縮物では **MTP 酸**エステル (No. 21) の方がアセテイト (No. 29) よりも結晶歩留がはるかに高く，かつ結晶の純度も良好であつた。またA濃度のやや低い大ザメ肝油より得たものでは **MTP 酸**エステル (No. 19) とアセテイト (No. 28) の結

* ただし同一原料のものでも出発A濃縮物の精製の程度はそれぞれ異つている。すなわちMIP酸エステルは脱ステロール，ウレア処理，溶剤分別の各操作を経て精製したA濃縮物より得たものであるし，MTP 酸エステルはさらに吸着処理による精製を行なつたA濃縮物より得た。またアセテイトは吸着処理までの精製を行なつたA濃縮物をアセチル化し，分子蒸留によりさらに精製したものである。

Table 4. 種々の原料より得た A 濃縮物の MTP 酸および MIP 酸エステルの結晶化
Crystallization of the purified esters obtained from various materials as in Table 5.

エステルの種類 Kind of ester	使用したエステル Ester used			粗結晶 Crude crystal			精製結晶 Purified crystal		
	種類* Kind	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A歩留 V. A. yield %	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A歩留 V. A. yield %
MTP酸エステル	No.19	10.8	172	3.9	170	36	1.8	196	19
	21	18.9	179	11.1	197	65	9.4	207	58
Monomethyl-terephthalate	18	5.5	144	1.8	154	35	0.4	189	9.6
	23	26.6	164	8.5	175	34	1.6	196	7.2
MIP 酸エステル Monomethyl-isophthalate	25	14.3	117	6.5	152.5	60	3.2	197	38**
	26	11.2	114	5.2	146	60	2.6	194	35

* 第2表の番号を示す。 Represented by the test number in Table 5.

** 結晶を除去した沪液を合せ，再び冷却し粗結晶を得，再結して精製結晶を得た。これを計算に入れると 45% となる。
Crystals were also recovered from the filtrates in the first and the second crystallization. If they are combined, the yield reaches 45%.

Table 5. 種々の原料より得た A 濃縮物アセテイトの結晶化
Crystallization of acetate of vitamin A concentrate obtained from various materials.

試験番号 Test No.	原料の種類 Kind of material	A濃縮物試料 Vitamin A concentrate used		得られたアセテイト Acetate obtained			精製結晶 Purified crytsals obtained		
		重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A回収率 V. A. recovery %	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A歩留 V. A. yield %
27	カジキ肝油 Marlin liver oil	53.7	191	56.5	161.5	89	5.5	248	13.3
28	大ザメ肝油 Shark liver oil	43.5	217	48.9	196.5	102	7.5	256.5	24
29	メヌケ肝油 Roch fish liver oil	52.75	244	58 9	217	99.1	17.5	253	34.5

晶歩留はほぼ同様となり，さらに A 濃縮物の A 濃度が低くなると **MTP 酸**エステルの結晶は析出しなくなる。すなわちカヂキ肝油を原料とした A 濃縮物では **MTP 酸**エステル (No. 15, 16, 17) が結晶しないのにアセテイト (No. 27) は結晶した。ただし前述のように原料の精製程度がアセテイトの方がよいので一旦カジキより得た A 濃縮物をアセテイトとし蒸留し，さらに鹸化して回収し，再び **MTP 酸**エステルとしたもの (No. 18) につき試験したところ結晶化した。またアセテイトの結晶を完全に除去し，もはやアセテイト結晶が析出しないような残渣を鹸化し得た A 濃縮物の **MTP 酸**エステル (No. 22, 23, 24) の場合にも，1例ではあるが結晶が得られた。

以上の実験の結果によれば，A 濃度の高い A 濃縮物は **MTP 酸**エステルにすることにより，アセテイトとするよりもはるかに高い歩留で結晶化することができる。しかし A 濃度の低い原料では，**MTP 酸**エステルとする前に，少なくともアセテイトと同程度の精製を行う必要があろう。

また **MIP 酸**エステル (No. 26) は，**MTP 酸**エステルやアセテイトとしては結晶化することのできないような，精製度の劣る A 濃縮物を原料とした場合でも非常に良好な歩留で結晶となつた。

さらに濃縮および結晶化が非常に困難な，スケソウ肝油よりの A 濃縮物も **MIP 酸**エステルとすることに

より好収率で結晶化することができた。

他のエステルおよびウレタンとの比較。 つぎに結晶の歩留を従来得られた結晶性エステルおよびウレタンの場合を比較してみよう。Table 6 に示したのは諸研究者によつて発表された各種 A エステルの結晶歩留である。用いられた A 試料の種類および純度が異るので厳密な比較は困難であるが，合成 A 試料は天然 A 試料よりも結晶の収率は良好であること，A 試料の純度が低くなるにつれ結晶歩留は急激に減少すること（特にアセテイト，パルミテイト，サクシネイト等にいちじるしい）などの事実を考慮してこの表を見れば，**MTP 酸**エステルの歩留は他のナフトエイト，*p*-フェニルアゾベンゾエイト等よりは良好であり，**MIP 酸**エステルの歩留は他のエステルよりもよく，ウレタンの結晶歩留に匹敵すると考えられる。

Table 6. 従来得られた結晶性 A エステルおよび A ウレタンの収率
Yield of crystalline vitamin A esters and urethanes obtained on previous occasions.

研究者 Investigator		Baxter[1] et al.	Isler[2] et al.		Mead[3] et al.	阿河等 Akawa et al.[4][5]			著者 Present author
使用したA試料 Vitamin A used		天然結晶Aアルコール Natural crystalline vitamin A alcohol	合成 A Synthetic vitamin A		天然A濃縮物 Natural vitamin A concentrate	天然A濃縮物 Natural vitamin A concentrate		合成 A Synthetic vitamin A	天然A濃縮物 Natural vitamin A concentrate
A 試料の純度 % Purity of vitamin A (A単位 V·A potency 10^4I.U./g)		100	50	60	87	52 (170)	72 (237)	91 (300)	53 (174)
結晶収量 Yield of crystals to theoretical (%)	Palmitate	48							
	Anthraquinone-β-carboxylate		44*						37
	p-Phenylazo-benzoate			16					
	β-Naphthoate	58	37*		3.3				
	Acetate	75							
	Succinate	46							
	β-Naphthylurethane					41–50*	72*	79*	
	Biphenylurethane					43–57*			
	Phenylazophenyl urethane					26*			

* 粗結晶の収量 Yield of crude crystals.

考　　察

本実験においては，前報で予想したように，フタル酸類の一方の酸基をあらかじめ適当なアルコールと結合させた後モノクロリドとし A 濃縮物と反応させてエステルとする方法が，エステル化に際し A の損失をなくし，しかもエステルの結晶化を容易にすることを示した。しかしながらこの方法でも**MTP 酸**，**MIP 酸**のエステルと異り **MP 酸**エステルはエステル化の際の A 回収率も悪く，結晶にもならなかつた。この理由としては色々のことが考えられるが，**MP 酸**エステルの場合に A がアンヒドロ A に変ることも原因の 1 つである。前報において **P 酸**エステルの場合にもアンヒドロ A が生成することをみとめたから，アンヒドロの生成は **MP 酸**または **P 酸**を酸クロリドとして A と反応させたときにみられる特有な現象のように思われる。

そこでまず一般に A と酸クロリドを反応させた時，アンヒドロ A の生成するのは何故か，そしてオルト

配置をとる **MP 酸**あるいは **P 酸**とメタあるいはパラ配置の，他のフタル酸類との構造上の差異がこれと関連があるかどうかについて考えてみた。

著者の経験によれば，この場合 A がアンヒドロ A に変る時と変らぬ時がある。すなわちアセチルクロリド，パルミチルクロリド等と A とを反応させた場合にはアンヒドロ A は生成しない[6] がジニトロ安息香酸クロリド等の場合は A はほとんどアンヒドロ A に変る。また従来の研究により A が脱水されてアンヒドロ A になる反応は HCl のような酸の存在により促進されることは知られているが，A が酸クロリドと反応してエステルとなる反応においても，酸の酸性が強いと A がアンヒドロ A となるのではないかと想像される。そこで酸クロリドとして A と反応させたことのある酸の中から文献により解離定数の判っているものをぬきだし，アンヒドロ A の生成の有無との関係を見た。Table 7 に示したのがこの関係であるが，解離定数が 1.0×10^{-3} 以上の酸を酸クロリドとして A と反応させた時には例外なくアンヒドロ A を生成していることが判つた。たとえば酢酸，安息香酸をクロリドとして A と反応させてもアンヒドロ A が生成しないのに，モノクロル酢酸，ジニトロ安息香酸のクロリドを用いると，ほとんど A がアンヒドロ A に変ることは Cl 基，NO_2 基の導入により酸の解離定数がいちじるしく増大することにより説明できるであろう。フタル酸類の場合においてもオルト位置に酸基が存在することは，メタおよびパラ位置に存在する場合よりも解離定数は大となることは一般にみとめられている事実であるし，実際の解離定数の大さも表に示すとおりであるから **P 酸**および **MP 酸**の場合のみ，アンヒドロ A が生成してもよいように思われる。

Table 7. 酸の解離定数とアンヒドロ A 生成の関係
Relation between the dissociation constant of acid and formation of anhydrovitamin A in esterification.

酸の種類 Kind of acid	温度 Temp. °C	解離定数 Dissociation constant	アンヒドロ A 生成の有無 Formation of anhydrovitamin A
酢酸 Acetic acid	25	0.0175×10^{-3}	−
モノクロル酢酸 Monochloracetic	25	1.4×10^{-3}	+
安息香酸 Benzoic	25	0.0631×10^{-3}	−
3-5-ジニトロ安息香酸 3-5-Dinitrobenzoic	25	1.51×10^{-3}	+
リン酸 Phosphoric	25	7.52×10^{-3}	+
コハク酸 Succinic	25	0.087×10^{-3}*	−
β-ナフタリン酸 β-Naphthoic	25	0.068×10^{-3}	−
P 酸 Phthalic (ortho)	25	1.0×10^{-3}*	+
TP 酸 Terephthalic (para)	18	0.29×10^{-3}*	−
IP 酸 Isophthalic (meta)	16	0.31×10^{-3}*	−

* Dissociation constant for dibasic acid is for the first hydrogen.
2 塩基性酸は第 1 解離定数を示した。

摘　要

モノメチルエステルフタル酸類のモノクロリドによる A 濃縮物エステルの製造実験を行ないつぎの結果を得た。

1) エステル化における A 回収率は良好で，一定した値が得られた。

2) モノメチルエステルフタル酸（**MP 酸**）エステルの製造時に A がアンヒドロ A に変化することが認められた。

3) 得られたエステルは **MP 酸**の場合を除き結晶化し得た。この場合，モノメチルエステルイソフタル酸（**MIP 酸**）エステルはモノメチルエステルテレフタル酸（**MTP 酸**）エステルより結晶性がすぐれていた。

4) **MTP 酸**エステルの結晶性は A 濃度の高い A 濃縮物を試料とした場合，アセテイトよりまさつている。

5) **MIP 酸**エステルの結晶性は精製程度の低い A 濃縮物を試料とした場合でも，従来得られたアセテイトおよび他のエステルにまさり，Aウレタンに匹敵する。

文　　献

1) J. G. Baxter and C. D. Robeson: J. Amer. Chem. Soc., **64**, 2408～2410 (1942).
2) O. Isler, W. Huber, A. Ronco u. M. Kofler: Helv. Chim. Acta, **30**, 1911 (1947).
3) T. H. Mead, S. W. F. Underhill and K. H. Coward: Biochem, J. **33**, 589 (1939).
4) 阿河利男・江幡泰行・小森三郎: 工化, **58**, 106 (1955).
5) 阿河利男・塩見卓司・小森三郎: 工化, **59**, 1040 (1956).
6) 衣巻豊輔: 日水誌, **20**, 1027～1034 (1955).

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—XIII.

ビタミンA濃縮物のエステル化 (其の5)
フタル酸類のモノビタミンAエステルの性状

衣 巻 豊 輔

(1960 年 11 月 24 日受理)

STUDIES ON THE ECONOMICAL MANUFACTURE OF VITAMIN A CONCENTRATE FROM FISH LIVER OIL—XIII.

ESTERIFICATION OF VITAMIN A CONCENTRATE
5. PROPERTIES OF MONOVITAMIN A ESTERS OF PHTHALIC ACIDS

Toyosuke KINUMAKI*

As described in the former paper (Series XII), the author obtained crystalline vitamin A ester of monomethyl ester phthalic acids from vitamin A concentrates.

In this work, properties of the esters were examined.

i) Physical and chemical properties of esters

Photos of purified specimens of monomethyl terephthalate and monomethyl isophthalate are shown in Figs. 1 and 3. Their properties such as melting point, ultra violet absorption, saponification value and solubility are in Table 1 and Figs. 2 and 4. The data show that these two esters are monovitamin A monomethyl terephthalate and monovitamin A monomethyl isophthalate respectively.

ii) Cis- trans isomerism of esters

The result by the reaction of vitamin A alcohol obtained from these two esters with maleic anhydride, revealed that the vitamin A composing these esters is all-trans form. See Fig. 5.

iii) Stability of esters

As indicated in Fig. 6, stability of crystalline vitamin A monomethyl terephthalate in oil solution was the same as that of vitamin A acetate. Stability of monomethyl isophthalate was also in the same order.

In Table 2, stability of these esters in the form of crystals is shown. Crystalline vitamin A monomethyl isophthalate was found better in stability than crystalline vitamin A urethanes which are well known as fairly stable vitamin A derivatives (Table 3).

iv) Crystals of m. p. 97~98°C from vitamin A monomethyl terephthalate

The auther obtained crystals which melt at 97~98°C, from monomethyl terephthalate of vitamin A concentrate left standing for a long time in ethyl formate. These crystals were different from vitamin A monomethyl terephthalate and could also be detected in crystalline vitamin A monomethyl terephthalate stored for weeks. Analytical data of these crystals were: acid value 0.3, saponification value 346 and nonsaponifiables ca. 60%. The spectrophtometric curve is shown in Fig. 7, but the structure of these crystals could not be determined.

緒 言

前報においてA濃縮物よりモノメチルエステルテレフタル酸 (**MTP 酸**) およびイソフタル酸 (**MIP 酸**)

* 東海区水産研究所 (Tōkai Reg. Fish. Res. Lab., Chuō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 341 号

のエステルを結晶として得たが，本報においては，このエステルの性状につき報告する。

実 験 の 部

1) 結晶の一般性状

A 濃縮物の MTP 酸エステルより得た精製結晶は，微細な黄色結晶であるが，これを蟻酸エチルで 1～2 回再結すると Fig. 1 に示すような淡黄色の針状結晶となる。更に注意して再結をかさねると無色になるが融点その他の特数は薄黄色のものと変らない。その性状は Table 1 および Fig. 2 に示す通りで，合成 A から得た MTP 酸エステルと混融して融点降下をみとめ」なかつた。したがつて，この結晶は Monovitamin A monomethyl terephthalate であると認められる。純結晶は結晶性に富み 5°C 程度で蟻酸エチル溶液より析出し，10 万単位程度のサラダ油溶液としても室温の低い時には結晶が析出する。

Fig. 1. A の MTP 酸エステルの結晶（蟻酸エテルより再結）偏光顕微鏡写真．右上に示したのは普通顕微鏡写真による拡大図。

Crystalline monovianmin A monomethyl terepethalate (Recrystallized from ethyl formate)
Polarization photomicrograph. Upper right: Usual photomicrograph, slightly enlarged.

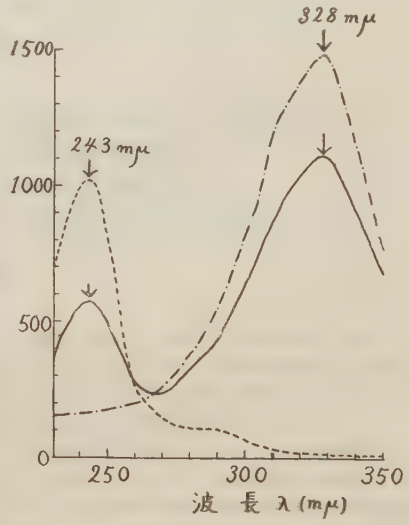


Fig. 2. A の MTP 酸エステル結晶 ——，A アセテイト -·-·- および MTP 酸 ····，の紫外部吸収曲線（イソプロパノール溶液）

Ultra violet absorption curves of crystalline monovitamin A monomethyl terephthalate ——, vitamin A acetate -·-·-, and monomethyl ester terephthalic acid ····, in isopropanol.

Table 1. A 濃縮物より得た MTP 酸および MIP 酸エステルの性状
Properties of crystalline monomethyl-terephthalate and isophthalate obtained from vitamin A concentrate.

エステルの種類 Kind of ester	融点 m.p. °C	紫外部吸収極大（イソプロ溶液） λ_{max}. of U.V. absorption (in isopropanol)	$E^{1\%}_{1cm}$ 値 (328 mμ) 実測 Found	$E^{1\%}_{1cm}$ 値 (328 mμ) 計算* Calcd.	鹸化価 Sap. value 実測 Found	鹸化価 Sap. value 計算** Calcd.	溶解性 Solubility
MTP 酸エステル Monomethyl-terephthalate	72～74	328mμ 243mμ	1103	1118	250	250.2	メタノール，エタノールに難溶，熱イソプロ可溶ベンゼン，石油エーテル，エーテルに可溶 Spar. sol. in MeOH and EtOH, sol. in hot isopropanol, sol. in benzene, pet. ether and ether.
MIP 酸エステル Monomethyl-isophthalate	105～106	328mμ	1111	1118	250	250.2	同上 same as above.

* Calculated from $E^{1\%}_{1cm}$ 325 mμ = 1750 for vitamin A alcohol.
** Calculated as monovitamin A monomethyl ester.

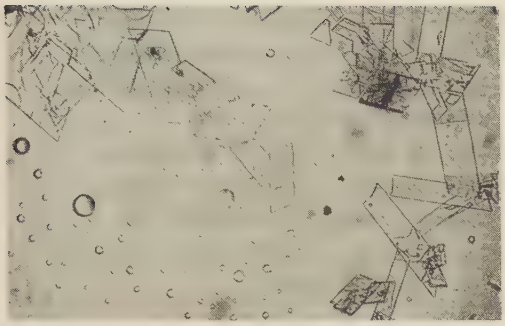


Fig. 3. A の MIP 酸エステルの結晶（蟻酸エテルより再結）
Crystalline monovitamin A monomethyl isophthalate (Recrystallized from ethyl formate).

MIP 酸エステルも同様に蟻酸エテルで1～2回再結すると Fig. 3 に示すような薄片状の比較的大きな結晶となる。この結晶は **MTP 酸**エステルの結晶よりもさらに結晶性に富み，室温で蟻酸エチル溶液およびサラダ油溶液より容易に析出する。その性状は Table 1 および Fig. 4 に示すごとくであり，Monovitamin A monomethyl isophthalate と考えられる。

2) 結晶を構成する A の立体異性

従来の報告によれば天然ビタミン油中にはトランス型の A のほかにシス型 A が含まれていることが知られているが，著者の得たAエステルを構成するAが，いかなる立体構造を有しているかを確めてみた。

MTP 酸および **MIP 酸**エステルの結晶をそれぞれイソプロパノールに加熱溶解し，メタノール性 KOH 溶液を加え鹸化し，遊離の A アルコールを得た。このAアルコールを P. A. PLACK の方法[1] にならつて無水マレイン酸と反応させ Fig. 5 に示す結果を得た。これより明らかなごとく，いずれも短時間で無水マレイン酸と反応し，ほとんど残存Aはみとめられなくなる。したがつてAの **MTP 酸**および **MIP 酸**エステル結晶は all-trans 型 A のみよりなると考えられる。

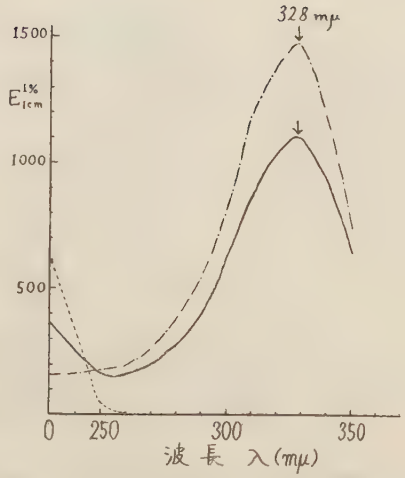


Fig. 4. A の MIP 酸エステル結晶 ——, A アセテイト -·-·- および MIP 酸 ····, の紫外部吸収曲線（イソプロパノール溶液）
Ultra violet absorption curves of crystalline monovitamin A monomethyl isophthalate ——, vitamin A acetate -·-·-, and monomethyl ester isophthalic acid ····, in isopropanol.

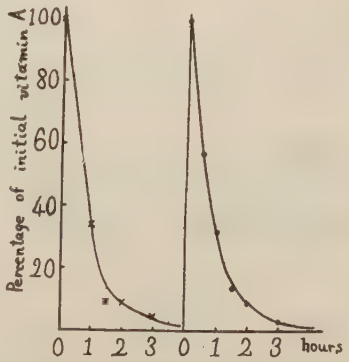
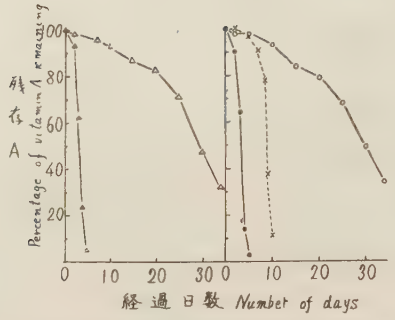


Fig. 5. A の MTP 酸エステル結晶（左）および MIP 酸エステル（右）より得たAアルコールと無水マレイン酸との反応（25°C）
Reaction of vitamin A alcohol from crystalline monomethyl terephthalate (left) and from crystalline monomethyl isophthalate (right) with maleic anhydride in benzene at 25°C.

3) 結晶の安定性

油溶液としての安定性。 **MTP 酸**エステルおよびアセテイトの結晶を 10 万単位のサラダ油溶液とし，先に報告した方法[2] にしたがつて安定性を試験した。その結果，Fig. 6 に示すように **MTP 酸**エステルの安定性は，アセテイトと全く同じであつた。また 12 万単位のメヌケ肝油を同時に試験したが，サステンを 0.25% 程度加えた **MTP 酸**エステル油溶液の安定性は肝油よりすぐれていた。



—▲— Solution of crystalline monovitamin A monomethyl ester terephthalate in salad oil (100,000 I.U./g)
—△— 〃 +0.25% of B. H. A.
—•— Solution of crystalline vitamin A acetate in salad oil (100,000 I.U./g)
—○— 〃 +0.25% of B. H. A.
···×··· Reckfish liver oil.

Fig. 6. Aの MTP 酸エステル結晶およびAアセテイト結晶のサラダ油溶液中における安定性ならびにメヌケ肝油中のAの安定性
Stability of crystalline monovitamin A terephthalate and vitamin A acetate in salad oil, and vitamin A in rockfish liver oil.

Table 2. Aの MTP 酸エステル，MIP 酸エステルおよびアセテイト結晶の安定性 (30°C)
Stability (percentage of initial potency) of crystallinevitamin A monomethyl-terephthalate, monomethyl isophthalate and acetate exposed to air at 30°C.

結晶性エステルの種類 Kind of crystalline ester		MTP酸エステル Monomethyl-terephthalate	MIP 酸エステル Monomethyl-isophthalate	アセテイト Acetate	
結晶の大きさ Size of crystal (平均径 average diameter)		0.5 mm	0.8 mm	2.3 mm	0.8 mm
経過日数 Time in days	1	99%	100%	100%	92%
	3	53 〃	92 〃	88 〃	73 〃
	7	42 〃	98 〃	91 〃	65 〃
	13	31 〃	93 〃	88 〃	68 〃

また **MIP 酸**エステルの結晶についても1万単位*のサラダ油溶液とし試験したが，**MTP 酸**エステルの場合と同じく，安定性はアセテイトと同様であつた。

結晶のままでの安定性。 結晶の状態での安定性をしらべるため，試料 0.1g を内径 12mm の小皿にとり 30°C の恒温器中に放置し安定性をしらべた。この場合，結晶の大きさが安定性に関係するので対照としてAアセテイトの結晶の中程度のもの，比較的小なるものを同時に試験した。その結果，Table 2 に示すように **MIP 酸**エステルの結晶は非常に安定であつた。これを従来得られた他の結晶性 A エステルの安定性と比較しても，BAXTER 等[3] および MEAD 等[4] により，β-ナフトエイト，パルミテイト，サクシネイト，β-アントラキノンカルボキシレイトの結晶の安定性はアセテイトと同程度かそれよりも劣ることが報告されているから **MIP 酸**エステルは従来の結晶のどれよりも安定である。

Table 3. A のウレタン結晶の安定性 (30°C)
Stability (percentage of initial potency) of crystalline vitamin A urethanes exposed to air at 30°C. (By AKAWA et al.)

結晶性ウレタンの種類 Kind of crystalline urethane		β-Naphthyl urethane	Biphenyl urethane
経過日数 Time in days	1	85	95
	3	80	88
	6	64	60

また阿河等[5] によれば A ウレタン結晶が非常に安定であると報告されているが，氏等の試験条件が著者の場合とほぼ同じであるから（ただし結晶の大さの記載はない）直接比較し得ると考え，Table 3 に氏等の結果を示した。これ

* 10 万単位にすると 30°C では結晶が析出するため1万単位の溶液とした。

より **MIP 酸**エステルの安定性はウレタンと比較しても劣らぬように思われる。

4) 長期間放置した A の MTP 酸エステルより生ずる融点 97～98°C の結晶

Aの **MTP 酸**の結晶（融点：71～73°C，A単位：196 万）を数週間 −20°C に放置した*。A単位が低下したので蟻酸エチルで再結したところ溶けにくい固体が存在したのでこれを採取し石油エーテルで数回再結したところ融点 97～98°C，A単位 165 万の結晶が得られた。さらに再結を繰りかえしても融点および単位は上昇しない。また溶剤に対してもAの **MTP 酸**エステルより溶けにくく，精製した結晶は石油エーテルより室温で容易に析出する。一方蟻酸エチルに溶けた部分からはAの **MTP 酸**エステルが得られた。したがつてこの結晶はAの **MTP 酸**エステルが変化して生じたものと考えられる。紫外部吸収曲線は Fig. 7 のとおりで，Aおよび **MTP 酸**あるいは **TP 酸**が主要部を占めていることは明らかである。著者はこの結晶はAの **MTP 酸**エステルとその分解によつて生じた遊離の **MTP 酸**（あるいは **TP 酸**）が混晶を作つたものではないかと考えたが，Aの **MTP 酸**エステルと **MTP 酸**あるいは **TP 酸**を用いて混晶が生成するかどうかをみたところ，混晶はできなかつた。またこの結晶の特数を測定したが，酸価：0.3，鹸化価：346 で遊離の **MTP 酸**が存在することは考えられない。不鹸化物含量は試料が少ないため正確ではないが，3回の測定により約 60% であつた。

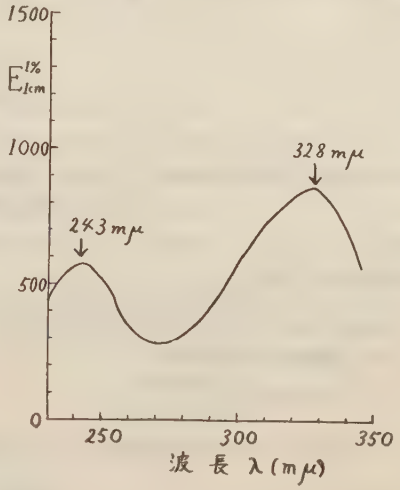


Fig. 7. 融点 97～98°C の結晶の紫外部吸収曲線（イソプロパノール溶液）
Ultra violet absorption curve of the crystals which melt at 97～98°C in isoproponol.

一方，前報において述べたようにA濃縮物のアセテイトよりアセテイトの結晶を除いた残渣を試料として **MTP 酸**エステルを製造したが，カジキ肝油より得たものではAの **MTP 酸**エステルの結晶は得られなかつた。そこでこのエステル 19.9g を蟻酸エチルに溶解し，ドライアイス中で長期間放置したところ沈殿が析出した。蟻酸エチルで数回再結することにより菊花状の結晶 0.5g を得た。融点 95～97°C，A単位 164.5 万で前記の結晶と同一物と考えられる。したがつてこの場合もAの **MTP 酸**エステルがこのものに変化し，溶剤に溶けにくくなるため析出して来たのであろう。

考　　察

著者は実験をはじめるにあたつて，Aのフタル酸類のエステルにおいても，従来知られているようにその融点はパラ位置の異性体のエステルの方がメタ，オルト位置の異性体のエステルよりも高いと予想したが，実験の結果によるとAの **MTP 酸**エステル（パラ位置）の融点よりも **MIP 酸**エステル（メタ位置）の方がかえつて高かつた。これは一見奇異に感じられるのでこれにつき考察してみた。

従来ベンゼン核に2コの置換基がパラ位置にある異性体がメタ位置にある異性体より融点が高いといわれているのは，2つの置換基の大きさがほぼ同じと考えられる場合にのみ成立するものとすれば，Aのフタル酸類エステルのように一方の酸基が分子量の小さいメタノールと結合し，他方の酸基が分子量の非常に大きいAと結合している場合はこれとは異なる融点関係が成立してもよいと思われる。もしそうであるならばAエステル以外のベンゼン核に2つの置換基を有する化合物にあつても，Aのフタル酸類エステルと同じようなパラ，メタ位置の異性体の間の融点逆転の関係がみられるはずである。そこでモノニトロ安息香酸を例としてみると，酸の融点は NO_2 基と COOH 基とがパラ位置にあるもの（m. p. 238°C）はメタ位置のもの

* この時真空中に封ずるとか，不活性ガスを充塡することなどの処置は行なわなかつた。

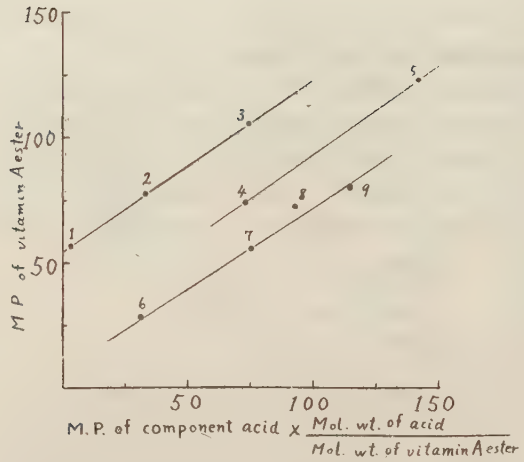
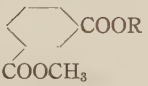
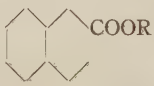
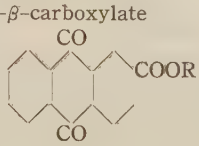
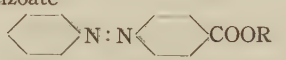


Fig. 8. A エステルの融点とエステルを構成する酸の融点との関係

Relation between the melting point of vitamin A ester and that of component acids.

1. Acetate CH_3COOR
2. Succinate $\begin{matrix}CH_2COOR\\ |\\ CH_2COOR\end{matrix}$
3. Monomethyl isophthalate 
4. β-Naphthoate 
5. Anthraquinone-β-carboxylate 
6. Palmitate $CH_3\cdot[CH_2]_{13}COOR$
7. Terephthalate $ROOC\langle\bigcirc\rangle COOR$
8. Monomethyl terephthalate $H_3COOC\langle\bigcirc\rangle COOR$
9. p-Phenylazobenzoate 

R = Vitamin A residue

(m.p. 140～141°C) より高く，メチル，エチル等のエステルにおいてもこの関係は変らず，従来知られた法則どうりである。しかし 2·4-ジニトロフェニールエステルの場合は，パラ位置のもの (m.p. 139～140°C) よりメタ位置のもの (m.p. 160°C) の方が却つて融点が高くなる。またトルイル酸，クロル安息香酸，アミノ安息香酸等のエステルにおいても結合するアルコールの分子が大となるにしたがい，パラ位置のものとメタ位置のものの融点は逆転こそしないが非常に差が少なくなつてくる。このようにベンゼン核に 2 つの置換基を有する酸では酸に結合するアルコールの分子が大きくなるとエステル融点はもとの酸の構造よりは分子全体の構造により支配されるようになり時として融点の逆転も起ると考えられる。

以上の考えよりすれば，Aのフタル酸類エステルにかぎらず他の酸のエステルにおいても，もとの酸の融点とその酸とAとのエステルの融点の関係を求めてみたら，エステル分子の構造の差異との間に関連性が見出されるのではないかと考えた。Fig. 8 に示すのがこれであるが，この際エステルを構成する酸の分子がアルコール（ここではA）に比しはなはだしく小さい時はそのエステルは酸よりもアルコールの性質に近く，この逆の場合は酸に近くなると考えられるから*，それを補正するため酸の融点にエステル中における酸の占める割合を表わす数値を乗じたものを酸の融点のかわりに用いた。この図によれば，Aのエステルは融点よりみて 3 つの系列に分けられるようである。これを下から 1, 2, 3 系列とすると，各系列に属するエステルはその間に共通した特徴が認められる。すなわち 1 系列に属するエステルは細かな針状時に片状に結晶し，分子の構造はどれも直線状に長い形をしている。2 系列のエステルはナフタレン核，アントラキノン核のような芳香族が横にならんだ構造を有し，結晶は細かな薄片状である。3 系列のエステルは一般に大きなプリズム状に結晶するが，その構造は 1 系列のものにくらべると酸の分子がAとのエステル結合の附近に小さくまとまつた構造を有している。これに属するエステルのもう 1 つの特徴は，その構成酸のクロリドまたはメチルエステルの融点が低いことで，これは他の系列の構成酸の場合といちぢるしく異る点である。

* たとえばコレステリンアセテイトは酢酸よりコレステリンに類似し，オレイン酸メチルはメタノールよりオレイン酸に類似する。

このように分類すると従来報告された非結晶性のAエステルすなわちステアレイト，オレエイト，ブチレイト，ベンゾエイト等は皆，酸の融点が低く，構造上も第1系列に属すので，エステルの融点も低く，そのため結晶しがたくなるのであろう。

このことは今後融点高きAのエステルを製造する必要が生じた場合には，酸の融点の大きさのみならず構造も考慮する必要があることを示している。もちろん前報において述べたごとくその酸はAとの反応にあたつてアンヒドロAを生成するものであつてはならないことは当然である。たとえばヂニトロ安息香酸は酸の融点および構造上よりは融点の高いAエステルを生成する条件をそなえていると考えられるが，解離定数が高いため実際にはAがアンヒドロAになり，Aエステルとすることは非常に困難である。

摘　　要

A濃縮物より得たモノメチルエステルテレフタル酸（**MTP 酸**）およびモノメチルエステルイソフタル酸（**MIP 酸**）のエステルの性状を調べた結果はつぎのようであつた。

1) 結晶の特数および紫外部吸収曲線の測定の結果，この結晶はそれぞれ Monovitamin A monomethyl terephthalate および Monovitamin A monomethyl isophthalate であつた。
2) エステルの結晶を構成する A は all-trans 型であつた。
3) 結晶の酸化に対する安定性は油溶液とした時はアセテイトと同様であるが，結晶のままでは非常に安定で，特に **MIP 酸**エステルの安定性は A ウレタンの安定性よりもすぐれていた。
4) 長期間放置した **MTP 酸**エステル結晶より生ずる融点 97～98°C の結晶の性状をしらべたが，本体は不明であつた。

本研究に当り，顕微鏡写真製作に御助力下さつた山田，高野両技官に深謝いたします。

文　　献

1) P. A. Plack: Biochem. J. **64**, 56～63 (1956).
2) 衣巻豊輔・田部井菊子: 日水誌, **20**, 539～550 (1954).
3) J. G. Baxter and C. D. Robeson: J. Amer. Chem. Soc., **64**, 2408～2410 (1942).
4) T. H. Mead, S. W. F. Underhill and K. H. Coward: Biochem. J., **33**, 589 (1939).
5) 阿河利男・横井繁雄・小森三郎: 工化, **58**, 686 (1955).

PHYSIOLOGICAL CHEMISTRY OF THE FRESH-WATER BIVALVES—III. ON THE TERMINAL OXIDASE SYSTEM OF FRESH-WATER COCKLE, *CORBICULA SANDAI*

Satoru Higashi*

(Received Dec. 5, 1960)

The waste water containing various chemicals drained from chemical factories has been known to give harmful effects on aquatic animals. Recently such troubles as the so-called water pollution have often occurred at the coastal area of Lake Biwa. The fresh-water cockle, *Corbicula sandai*, which is endemic to Lake Biwa, is one of the animals which are greatly affected by the water pollution.[1),2),3)]

The present investigation was undertaken to elucidate the mechanism of the terminal oxidation in the tissues of the fresh-water cockle, as a fundamental study on the effects of water pollution upon the aquatic animals. In the previous paper, the rate of endogenous respiration of various tissues and the effects of organic acids on the tissue respiration have been reported.[4)]

This paper deals with the effects of inhibitors on the endogenous respiration of various tissues and the identification of cytochromes in the tissues of *Corbicula sandai*.

Materials and Methods

The experimental materials, *Corbicula sandai*, were obtained through a fishery association near-by the Seta River. They were approximately 2 cm. in shell length.

Oxygen uptakes of preparations were measured at 25°C. using the Warburg's manometers with vessels of about 10 m*l*. capacity. Respiratory measurements were carried out using several pieces of thin tissue suspended in 2.0 m*l*. of the physiological saline used for the tissues of fresh-water mussels by Motley.[5)] To absorb CO_2, 0.2 m*l*. of 10% KOH and filter paper were placed in the center well. In the inhibitory test of cyanide, 0.2 m*l*. of KCN-KOH mixture was added to the center well instead of KOH.[6)] In the experiments of photo-reversibility of the carbon monoxide inhibition, a 500 watt projector lamp was switched on at the distance of 50 cm. away from the water-bath. The activity of cytochrome oxidase was measured manometrically at 25°C. according to the method of Schneider and Potter.[7)] The extract for the enzyme study was prepared by homogenizing the excised tissue with a glass homogenizer in five parts of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2).

The absorption bands of the reduced cytochromes were examined with a low-dispersion hand spectroscope at liquid-air temperature.[8)]

Carbon monoxide was prepared by decomposing formic acid with warm con-

* Biological Laboratory, Faculty of Liberal Arts, Shiga University, Otsu (滋賀大学学芸学部: 東 怜)

centrated sulfuric acid. Cytochrome *c* was purchased from the Nutritional Biochemicals Co.

Results

1. *Effects of cyanide and azide on the tissue respiration*

The endogenous respiration of gill, mantle and adductor muscle of cockle was depressed by 5×10^{-4} M cyanide or 10^{-3} M azide to 20~50% of the control and the inhibition was reversed by the addition of 5×10^{-3} M methylene blue (Table 1).

Table 1. Effects of respiratory inhibitors on the tissue respiration of *Corbicula sandai*

Tissues	Inhibition (−) or Acceleration (+) %			
	Cyanide 5×10^{-4} M	Cyanide 5×10^{-4} M Methylene blue 5×10^{-3} M	Azide 10^{-3} M	Azide 10^{-3} M Methylene blue 5×10^{-3} M
Gill	−54.8	+36.0	−47.5	+12.7
Mantle edge	−26.5	+76.8	−16.7	+13.3
Adductor muscle	−19.4	+30.4	−38.2	+10.0

Manometric measurements were started twenty minutes after the tissues were immersed in each medium containing the reagents. Each flask contained 100 mg. of tissue pieces in 2.0 m*l*. of physiological saline.

2. *Effect of carbon monoxide on the respiration of cockle tissues*

Inhibition experiments were performed using the gas mixture of (CO/O_2 ratio of

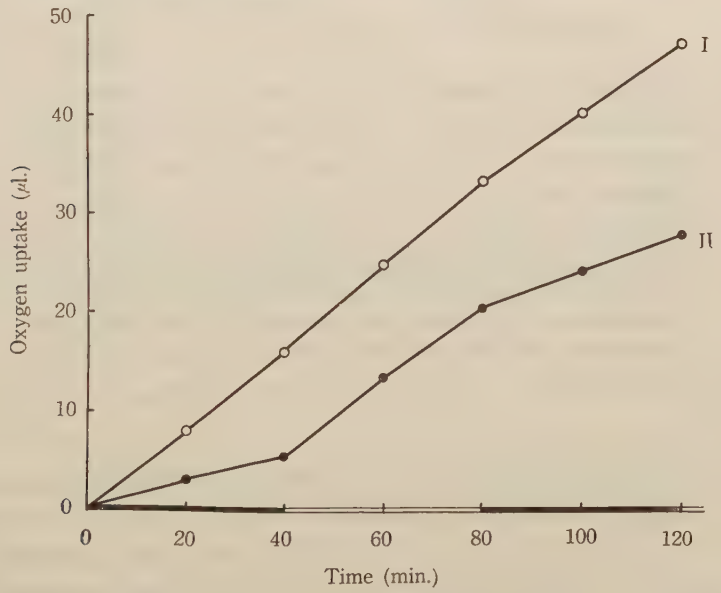


Fig. 1. Effect of carbon monoxide on the respiration of cockle gill. I, in 95% N_2+5% O_2; II, in 95% CO+5% O_2. Each flask contained 100 mg. of tissue pieces in 2.0 m*l*. of physiological saline (pH 7.2). Temperature 25°C. The black and white blocks on the abscissa show the periods of dark and light, respectively.

95/5). Controls with a gas mixture of nitrogen and oxygen (95/5) were also run, but there was no significant difference between oxygen uptakes in this control and in air.

As shown in Fig. 1, the oxygen consumption of the gill was reduced to 50% of the control by CO and the inhibition was found to be completely eliminated by light. Almost same results were obtained in the case of the mantle (Table 2).

Table 2. Respiration of cockle tissues in a gas mixture of 95% CO and 5% O_2.

Tissues	O_2 uptake in control*	CO inhibition in darkness** (%)	No. of determination
Gill	24.8	51	3
Mantle	16.2	43	3

* $\mu l.$ of O_2/100 mg. of wet tissue/hr.

** The nearly or almost complete elimination of CO inhibition by the illumination was observed in all tissues examined.

3. *Cytochrome oxidase*

As seen in Table 3, the oxygen uptakes of the tissue homogenates were accelerated by the addition of both cytochrome *c* and ascorbate, though the oxidase activity of the mantle was not so high compared with that of the gill.

Table 3. Cytochrome oxidase activity of the tissue homogenates of *Corbicula sandai*

Substances added	Oxygen uptake $\mu l.$/hr.	
	Gill	Mantle
Cytochrome *c*+Ascorbate	116	28.0
Cytochrome *c*	10	5.0
Ascorbate	20	7.0
Boiled enzyme	9	5.3
Endogenous respiration	11	5.4

Total volume of reaction mixture: 2.0 m*l.* Enzyme: 0.5 m*l.* of 20% tissue homogenate in each WARBURG flask. Final concentration of additions: cytochrome *c*, 1.6×10^{-5} M; ascorbate, 10^{-2} M; phosphate buffer at pH 7.2, 0.05 M. Temperature 25°C.

4. *Absorption spectra of cytochromes*

The absorption bands corresponding to cytochromes, *a*, *b* and *c*, could be clearly observed in the sperm at room temperature. In other tissues, such as gill, mantle, adductor muscle and unfertilized eggs, only the band of cytochrome *b* could be detected at room temperature. A feeble band of cytochrome *a* and a lesser band of cytochrome *c* appeared at liquid-air temperature except the eggs. In the unfertilized eggs, a very strong absorption band of cytochrome *b* and a feeble band of cytochrome *a* were observed, although the band of cytochrome *c* could not be detected even at liquid-air

temperature.

When a few drops of pyridine were added to the tissue preparations, a very strong pyridine-haemochromogen band extending from about 556 to 560 mμ, and a weak band lying about from 580 to 590 mμ were readily produced. They are considered to be the pyridine-haemochromogen bands of cytochromes *b* and *a* group, respectively.

Table 4. Observations on the absorption bands of reduced cytochromes in the various tissues of *Corbicula sandai* at liquid-air temperature.

Tissues	Relative intensity of the absorption		
	Cyt. *a*	Cyt. *b*	Cyt. *c*
Gill	+	##	±
Mantle	±	##	±
Adductor muscle	±	##	±
Sperm	##	##	###
Unfertilized eggs	±	###	−

The absorption bands of the reduced cytochrome were examined on intact thin tissues or cell suspensions after addition of a small amount of sodium hydrosulphite. The α-band of cytochrome *a*: 603 mμ; that of cytochrome *b*: 560~565 mμ at room temperature and 560 mμ at liquid-air temperature; that of cytochrome *c*: 550 mμ. The sign ## or ### indicates the very strong absorption, while the sign—shows the absence of cytochrome band. The sign ± shows that the absorption band is not so clear.

Discussion

Although the fresh-water cockle, *Corbicula saudai*, used in this investigation has no oxygen carrier such as haemoglobin or haemocyanin in the blood, its tissues possess a normal cytochrome system consisting of cytochromes *a*, *b*, *c* and cytochrome oxidase. The cytochromes are abundantly present in the sperm, where cytochrome *c* is predominant. In other tissues, however, cytochrome *b* is apparently more dominant than cytochrome *a* or *c*. These results are in agreement with the results obtained on the marine lamellibranchs.[9]

The fact that the concentration of cytochromes differs with type of tissue, suggests that there are certain qualitative differences in the electron transport system among the tissues.

Crandall and Drabkin have pointed that the concentration of cytochrome *c* in the tissue was directly proportional to the amount of oxygen consumption of it.[10] As previously reported,[4] the tissue respiration of the fresh-water cockle is very low (−0.56~1.80 as the Qo_2). The same relation may hold in the bivalve, in which the concentration of cytochrome *c* and the cell respiration are low in parallel.

As seen in Table 1, the respiration of cockle gill was depressed by 5×10^{-4} M cyanide to 50% of the control, while the respiration of mantle and adductor muscle

was depressed only 20% by the same concentration of cyanide. However, in the mixture of 95% CO and 5% O_2, the oxygen uptake of gill and mantle tissues was inhibited equally by about 50% in the dark and the inhibition was completely reversed by light. These results suggest that the cytochrome oxidase, which contains the iron atom in the active site, acts as a terminal oxidase in the intact tissues of fresh-water cockle.

The author wishes to express his gratitude to Prof. K. Nakamura of Zoological Laboratory of Kyoto University, Prof. K. Hayashi of Biological Laboratory, Prof. T. Hori of Chemical Laboratory of Shiga University, and Dr. K. Kawai of Biological Laboratory of Osaka University, for their encouragements and numerous facilities given during this investigation.

Summary

1) The effects of inhibitors on the endogenous respiration of various tissues and the identification of cytochromes in various tissues of fresh-water cockle, *Corbicula sandai*, were studied.

2) The respiration of gill, mantle and adductor muscle tissues was inhibited by 5×10^{-4} M cyanide or 10^{-3} M azide and the inhibition was reversed by the addition of 5×10^{-3} M methylene blue (Table 1).

3) In a gas mixture of 95% CO and 5% O_2, the oxygen uptake of gill and mantle tissues was inhibited by about 50% in the dark and the inhibition was completely reversed by light (Fig. 1 and Table 2).

4) Cytochrome oxidase activity of gill and mantle tissues was measured manometrically (Table 3). The absorption band of reduced cytochrome *b* was detected in all tissues examined, but the bands corresponding to cytochromes *a* and *c* were not detected at room temperature. A feeble bands of cytochromes *a* and *c* appeared at liquid-air temperature (Table 4).

5) These results lead to the conclusion that the respiration of fresh-water cockle tissues is mediated through the cytochrome system.

References

1) Hayashi, K.: *Jap. J. Malacology*, **19**, 238 (1957).
2) Hori, T. and Hashimoto, T.: *Mem. Fac. Lib. Art. Shiga Univ.*, **10**, 33 (1960).
3) Mizunuma, E.: *Rep. Shiga Pref. Fish. Exp. Station*, **10**, 1 (1958).
4) Higashi, S. and Teramura, F.: *Mem. Fac. Lib. Art. Shiga Univ.*, **10**, 55 (1960).
5) Motley, H. L.: *Physiol. Zool.*, **8**, 62 (1934).
6) Robbie, W. A.: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **27**, 181 (1949).
7) Schneider, W. C. and Potter, V. R.: *J. Biol. Chem.*, **149**, 217 (1943).
8) Keilin, D. and E. F. Hartree: *Nature*, **164**, 254 (1949).
9) Kawai, K.: *This journal.* **23**, 738 (1958).
10) Crandall, M. W. and Drabkin, D. L.: *J. Biol. Chem.*, **166**, 653 (1946).

雑　　録

○理　事　会

1. 日　時　　2月11日　午後1時30分
2. 場　所　　東京水産大学会議室
3. 出席者　　会長以下15名

議　題

1. 技術会議よりの問合せについて

5月上旬まで答申希望なので，委員会を作り問題点を審議し答申することとし，評議員および理事にこの会の要点を案内し，この委員となる諾否および委員長の選挙を依頼することとなつた。委員受諾者のうち在京者を常任委員とする。会の運営は委員長に一任する。

2. 昭和36年度評議員選挙における支部別選出数は支部所属会員数により次のようにした。

関東　東北　北海道　中部　近畿　中国，四国　九州
計　50名

3. 会誌27巻1号より，印刷部数を100部増加することとした。
4. 理事構成員について，編集長より編集会議で審議した結果の説明あり，会則変更があるので，3月理事会に提出することとなつた。
5. 外国会員の雑誌は1～12月号を1年分として取扱うこととした。
6. 4月大会における水産学会および海洋学会共催のシンポジウムには本年はプランクトン学会も共催することとなつた。
7. 4月評議員会の後で編集会議を行う。

○編集会議

1. 日　時　　2月11日　午後4時
2. 場　所　　東京水産大学会議室
3. 出席者　　編集長以下13名

議　題

1. 理事の後任を依頼する。
2. 抄録の案は河端理事が案を作り，それを次回に審議する。
3. シンポジウムのあり方については評議員で審議するようにする。
4. 校閲者が著者訂正後再読したいものは校閲用紙にその旨を記入する。
5. 次回は3月18日とする。

正　誤　表

(巻)	(号)	(頁)	場　所	(誤)	(正)
26	11	1111	Table 5. 7列，下より4行目	21.1	31.1
			Table 5. 8列，下より4行目	15.8	5.8
27	1	36	Table 2. 1列目	meta	pyro
			Table 2. 1列目	pyro	meta
			15行目	ピロ酸	ピロ燐酸
27	2	159	16行目	上記種	上記3種
〃	〃	160	22行目	APTで	ATPでの

	頁	誤	正
27	2 107～111	*Pinna atrina japonica* (REEVE)	*Pinna attenuata* REEVE

* 128頁　山本　正　　137頁　山本　忠　　印刷費負担

新着外国文献案内 (1961. 2. 1—28)

PERIODICALS

Annual Report. International North Pacific Fisheries Commission. Vancouver. 1955.
Bamidgeh (Bulletin of Fish Culture in Israels). Vol. 12. No. 3. 1960.
Boltin del Instituto español de oceanografia. Madrid. No. 98. 99. 100. 101. 102. 1960.
Bonner Zoologische Beiträge. Bonn. 11 Jahrgang. Heft 2-4. 1960.
Bulletin. Fisheries Research Board of Canada. No. 124. 1960.
Bulletin. Florida State Museum. Gainesville. Director's Report 1959-1960.
Chesapeake Science. Solomon. Maryland. Vol. 1. No. 2. 1960.
Circular. Atlantic Biological Station. General Series. Saint Andrews, New Brunswick. No. 33. Sept. 1960.
Commercial Fisheries Outlook. U.S. Fish and Wildlife Service. Washington. Jan.-Mar. 1961.
Commercial Fisheries Review. U.S. Fish and Wildlife Service. Washington. Vol. 22. No. 12. 1960.
Cruise Report. Dept. Interior. U.S. Fish and Wildlife Service. Bureau of Commercial Fisheries. February 9. 1961.
Current Bibliography for Aquatic Sciences and Fisheries. F.A.O. Annual Index-1959.
Fish Bulletin. State of California. Dept. Fish and Game. Sacramento. No. 109. 1960.
Fishery Investigations. Ministry of Agriculture and Fisheries. London. Series II. Vol. XXIII. No. 2. 1960.
Jahresbericht über die deutsche Fischwirtschaft. Berlin. 1959.
Il Giornale della Pesca. Rome. Anno X. No. 20. 1960.
Philippine Abstracts. Manila. Vol. 1. No. 1. 2. 1960.
Publicacines del Instituto de biologia aplicada. Barcelona. Tomo XXXI. 1960.
Tidsskrift for Hermetikindustri. Kristiania. 46 Årgang. Nr. 12. 1960.
Trabajos del Instituto español de oceanografia. Madrid. No. 29. 1960.
Tulane Studies in Zoology. New Orleans. Vol. 8. No. 3. 1960.
U.S. Industrial Digest. Vol. 3. No. 1. 1961.
Visserij-Nieuws. s'Gravenhage. 13 Jaargang. No. 8. 1960.

REPRINTS

Bentley, J. A. (1960) Plant hormones in marine phytoplankton, zooplankton and sea water. J. mar. biol. Ass. U. K. Vol. 39. pp. 433-444.
Blaxter, J. H. S. (1960) The effect of extremes of temperature on herring larvae. J. mar. biol. Ass. U. K. Vol. 39. pp. 605-608.
Brook. A. J. (1959) The Published Figures of the Desmid Staurastrum paradoxum. Revue Algologique. Nouvelle Serie Tome IV. No. 4. pp. 239-255.
Fϕyn, E. (1960) Et apparat for Kontinuerlig maaling av opplϕst oksygen i sjϕvann. Tidsskrift for kjemi, bergvesen og metallurgi Vol. 5. pp. 109-110.
ϕritsland, T. (1960) Fur seals breeding in the South Orkney Islands. Norsk Hvalfangst-Tidende. No. 5. pp. 220-225.
Hobbs, G. and Hodgkiss, W. (1960) Modification to an electron microscope grid-holding device. Journal of Bacteriology. Vol. 80. No. 1. pp. 140-141.
Holliday, F. G. T. and Blaxter, J. H. S. (1960) The effects of salinity on the developing eggs and larvae of the herring. J. mar. biol. Ass. U. K. Vol. 39. pp. 591-603.
Jonsgard, A. (1960) On the Stocks of Sperm Whales (Physter catodon) in the Antarctic. Norsk Hvalfangst-Tidende. No. 7. pp. 289-299.
Kabata, Z. (1960) Observations on Clavella (Copepoda) parasitic on some British Gadoids. Crustaceana. Vol. 1. pp. 342-352.
Mills, D. H. (1959) Salmon Smolt Tagging Experiments at Invergarry Salmon Hatchery. Rapp. et. proc.-verb. Cons. Internat. Explor. de la Mer. Vol. 148. pp. 8-10.

Mills, D. H. (1960) Hooded crow and red-necked grebe as predatores of salmon. Scottish Birds. Vol. 1. No. 9.

Morgan, N. C. and Waddell, A. B. (1960) Chorinomidae (Diptera) New to Perthshire including some Species New to Britain. The Entomologist for March 1960. pp. 62-69.

Shearer, W. M. (1959) Some Notes on the Efficiency of two Types of Tag used for Tagging Sea-Trout Kelts in the River Dee, Aberdeenshire. Rapp. et Proc.-Verb. Cons. Internat. Explor. de la Mer. Vol. 148. pp. 17-18.

Smith, I. W. (1960) Furunculosis in Salmon Kelts. Nature. Vol. 186. No. 4726. pp. 733-734.

Stuart, T. A. (1959) The influence of drainage works, levees, dykes, dredging, etc. on the aquatic environment and stocks. Athenes Proceedings of the I. U. C. N. Technical Meeting, 1959. Vol. IV. pp. 337-345.

Waterman, J. J. ( ) Fishroom insulation and refrigeration, Some Experiences on a Modern Trawler. (Torry Memoir No. 43) pp. 1-2.

SEPARATE VOLUMES

Baxter, J. L. (1960) Inshore Fishes of California. State of California. Dept. Fish and Game. Sacramento.

U. S. Navy Hydrographic Office (1945) Ocean Currents in the Vicinity of the Japanese Islands and China Coast. (H. O. Pub. No. 237).

——— (1947) Wind Waves at Sea Breakers and Surf. (H. O. Pub. No. 602).

——— (1951) Techniques for Forecasting Wind Waves and Swell. (H. O. Pub. No. 604).

——— (1959) Instruction Manual for Oceanographic Observations (H. O. Pub. No. 607).

——— (1951) Processing Oceanographic Data. (H. O. Pub. No. 614).

——— (1958) Observing and Forecasting Ocean Waves by means of Wave Spectra and Statistics. (H. O. Pub. No. 603).

——— (1959) A practical method of predicting sea ice formation and growth (Technical Report 4).

——— (1955) Preliminary investigations on predicting properties of bottom pressure fluctuations. (Technical Report 14).

——— (1955) U. S. Navy Hydrographic Office synoptic and prognostic Wave Charts. (Technical Report 16).

——— (1958) An evaluation of the "Morskoi Atlas" (With Translations from Volumes I and II) (Technical Report 38).

——— (1960) Visual wave observation (Special Publication 44).

——— ( ) Monthly surface temperature charts of the North Pacific Ocean (H. O. Miscel. No. 10577).

——— ( ) Monthly surface temperature charts of the Indian Ocean (H. O. Miscel. No. 10619).

会誌 論文集 合本用ファイル (B5判) 実費頒布御通知

水産学会誌1年分を簡単に製本出来る。

冊誌を傷めず保存できる。

穴をあげず，糊も使わず合本出来る。

中の何れでも取外しが簡易。

頒価　厚さ 4.5 cm　¥ 120

〃　6.0 cm　¥ 130

〒 ¥ 20

御希望の向は代金を添え日本水産学会事務局へ御申越下さい。

○学会所定原稿用紙 価格送料共　金 100 円

昭和三十六年三月二十日 印刷
昭和三十六年三月二十五日 発行

第二十七巻 第三号

本号定価 130 円
(送料別)

編集兼発行者　大島泰雄
東京都港区芝海岸通り6丁目　東京水産大学内

発行所　日本水産学会
東京都港区芝海岸通り6丁目　東京水産大学内
振替口座 東京 59529番
電話 (451) 2200番

印刷者　笠井康頼

印刷所　株式会社 国際文献印刷社

発売所　株式会社 国際文献印刷社
東京都新宿区山吹町184
電話 (341) 7446・9635